



TITLE:

薬剤過敏症性免疫応答とその予測
バイオマーカーに関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

田村, 明敏

CITATION:

田村, 明敏. 薬剤過敏症性免疫応答とその予測バイオマーカーに関する研究. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12850>

RIGHT:

薬剂過敏症性免疫応答とその予測バイオマーカー
に関する研究

田村 明敏

目次

要旨.....	1
第一章 序論.....	3
第二章 材料と方法.....	14
第三章 結果.....	21
第一節 D-Pen 投与による皮膚症状の発現は SD ラットでは発現せず, BN ラットでのみ発現する.....	22
第二節 PHT および CBZ を投与した BN ラットでは皮膚症状は発現しないが, D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは共通して二次リンパ組織/器官に胚中心過形成がみられる.....	25
第三節 BN ラットでは薬剤過敏症リスクの高い薬剤の投与でのみ胚中心過形成が発現する.....	32
第四節 D-Pen 投与による BN ラットでの胚中心過形成には一定の投与量と投与期間が必要である.....	40
第五節 薬剤過敏症リスクの高い一部の薬剤は SD ラットでも胚中心過形成を発現させる.....	40
第六節 D-Pen, PHT および CBZ 投与により誘導される BN ラットおよび SD ラットの脾臓における胚中心には濾胞性ヘルパーT 細胞と局在を同じくする T 細胞が存在する.....	41
第七節 D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは末梢におけるリンパ球サブセットの割合が異なる.....	44
第八節 D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは血中サイトカインプロファイルが異なる.....	49
第九節 D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットの脾臓では一過性に Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 細胞の割合が増加するが, D-Pen を投与した BN ラットの脾臓ではその後 Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ T 細胞の割合が増加する.....	51
第四章 考察.....	54
文献.....	69
謝辞.....	81

要旨

薬剤過敏症は皮膚症状の発現を特徴とする免疫介在性の医薬品の副作用である。薬剤がハプテンとなり惹起される種々の免疫反応により同症状が発現すると考えられているが、その発症メカニズムは不明な点が多い。本研究では薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤投与によってもたらされる免疫反応についてアレルギー高感受性動物である Brown Norway ラット（BN ラット）を用いて検討した。薬剤は D-ペニシラミン、フェニトイン、カルバマゼピン、アモキシシリン、スルファメトキサゾールを用いた。D-ペニシラミンを投与した BN ラットでは薬剤過敏症患者の臨床症状としてみとめられる皮膚症状や血液中の炎症性細胞の増加、IgE レベルの上昇が認められたが、他の薬剤では皮膚症状の発現は認められず、これらの炎症性反応についても一部の薬剤でしか認められなかった。一方、いずれの薬剤を投与した動物においても二次リンパ組織/器官に胚中心過形成が誘導され、一部の薬剤についてはアレルギー低感受性動物の Sprague Dawley ラットでも同様の結果を得た。また、これらの動物では外来抗原に対して分化誘導される濾胞性ヘルパーT 細胞と局在を同じくする T 細胞が胚中心に認められ、薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤は共通してハプテンとしての性質をもっている可能性が示唆された。一方で、皮膚症状の発現は D-ペニシラミンを投与した BN ラットに限られたことから、薬剤過敏症の発症には薬剤のハプテン化以外の要因の必要性が示唆された。同動物と他の動物では共通して脾臓において一過性の Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の増加が認められた。一方、D-ペニシラミンを投与した動物では血液中の IFN γ 、IL-2、IL-4 および IL-10 の発現変化が認められ、皮膚症状の発現後の特徴的な変化として脾臓において Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の増加がみられた。以上より、薬剤投与に伴って認め

られる Th1/Th2/Treg バランスの変化や，継続投与による非抑制性の T 細胞の出現が薬剤過敏症の皮膚症状の発現に関与している可能性が考えられた．また，すでに報告されている知見とも合わせて，二次リンパ組織/器官に発現する胚中心過形成をバイオマーカーとした薬剤過敏症の発症を予測する新しい動物モデルを提唱する．

第一章

序論

薬剤過敏症について

薬剤過敏症は治療用量での投与によって引き起こされる免疫介在性の医薬品の副作用である。この免疫介在性の副作用は医薬品の服用によって生じるすべての副作用のうち 6~10%を占めるといわれており、医薬品を服用した場合の薬剤過敏症の発症リスクは 1~3%とされている (Borda *et al.*, 1968; Johnson and Bootman, 1995; deShazo and Kemp, 1997)。例えば、薬剤過敏症の 1 つとして分類されるアナフィラキシーも非常に稀にしか発現しないものではなく、入院患者では 3000 人に 1 人の割合でみられると報告されている (Neugut *et al.*, 2001)。

薬剤過敏症の発症によって傷害を受ける組織/器官は多岐にわたり、アレルギーを含め様々な症状が、複数の機序によって発現することが知られている (Khan and Solensky, 2010)。皮疹は薬剤過敏症の発症を象徴する症状であるが、他にも血液学的異常や、肝炎、肺炎、腎炎、リンパ節の腫脹といった症状を併発することがある。しかしながら、これら皮疹以外の症状が発現したとしてもそれらは薬剤過敏症に特異的なものではなく、これらの発現をもって薬剤過敏症として診断し、治療方法を選択することはできないといわれている。薬剤過敏症の発症が皮疹の発現によって定義されるのはこのためであると考えられる。

薬剤過敏症の皮疹とその他の臨床症状

薬剤過敏症でみられる皮疹を薬疹と呼ぶが、その外見的症状は発疹のみが発現するものから傷害性の皮膚症状を伴うものまで様々である (McKenna and Leiferman, 2004; Roujeau, 2005)。

最も頻度高くみられる薬疹は発疹性薬疹 (Exanthematous drug eruptions) と分類されるもので、症状としては紅斑 (Erythematous macules) や紅斑性丘疹

(Erythematous papules) と呼ばれる発疹が胴体の上部や頭部、頸部などに発現し、掻痒や発熱を伴うものである (Hunziker *et al.*, 1997). 固定薬疹 (Fixed drug eruptions) は発症頻度としては 2 番目に多くみられる薬疹であり、原因薬剤の投与により繰り返し同じ部位に発疹を生じることを特徴する (Korkij and Soltani, 1984). 発疹性薬疹と同様の発疹が全身に発現するが、特に顔面や口唇、手足、生殖器に高頻度に発現することが知られている (Lisi and Stingeni, 1993). また、掻痒や発熱といった症状が発疹性薬疹と類似することから固定薬疹は発疹性薬疹の特殊型と考えられている.

蕁麻疹 (Urticaria) は紅斑性丘疹とともに紅斑性浮腫状丘疹 (Erythematous and oedematous papules) が全身に発現する皮疹であり、その皮疹の範囲が真皮や皮下組織まで及んだ場合に血管性浮腫 (Angioedema) と定義される. 血管性浮腫は主に青白色や薄赤色の腫脹として顔面 (主に眼瞼や口唇、耳) や頬粘膜、舌、喉頭、咽頭などにみられ、蕁麻疹や血管性浮腫といったこれらの皮疹は薬疹の約半数でみられるとされている (Bircher, 1999; Nigen *et al.*, 2003). 蕁麻疹や血管性浮腫に付随して発現するのが致死性のアナフィラキシーであるが、多くの場合、患者で血中の総 IgE レベルの上昇、もしくは抗 IgE 抗体の存在が確認される (Sabroe *et al.*, 1999). また、アナフィラキシーが発現した場合には症状として呼吸困難や急激な血圧低下、頻脈などの症状が発現することが知られている (Park *et al.*, 2000).

このように薬剤過敏症でみられる皮疹にはいくつか種類が存在するが、以下に示す薬剤過敏症では皮膚症状の他に特徴的な臨床症状を示すことが報告されている.

急性全身性発疹性膿疱症 (Acute generalized exanthematous pustulosis: AGEP) は高熱と膿疱性発疹の発現に特徴付けられる薬剤過敏症であり、首や腋

窩部，鼠径部などにみられる広範囲に及ぶ浮腫性紅斑上に小型の非毛嚢性膿疱が多数みられる．臨床症状としては好中球数の増加を主とする白血球増加症を伴うことが多く，そのおよそ 3 分の 1 の割合において好酸球数の増加も認められている (Roujeau, 1991; Beylot *et al.*, 1996).

DRESS 症候群 (Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome: DRESS syndrome) と呼ばれる薬剤過敏症は種々の皮疹の発現とともに，様々な全身症候と好酸球増多症の 2 つを特徴とする (Bocquet *et al.*, 1996). その全身症状の例としては皮膚炎，リンパ節腫脹，高熱があり，また複数の臓器障害を伴う．臓器障害としては肝炎や好酸球肺浸潤，間質性腎炎などが挙げられ，他の臓器も同様に影響を受けていると考えられている (Guillon *et al.*, 1992). DRESS 症候群では血液学的異常として好酸球増多症が共通して認められるが，それに先行する臨床症状として末梢血中に異型リンパ球数の増加や好中球数の増加がみられることが多いといわれている．また，皮疹や肝炎の症状は医薬品の服用中止後に発症し，それによって死亡する確率はおおよそ 10%とされている (Kaur *et al.*, 2002).

スティーブンス-ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome: SJS) や中毒性表皮剥離症 (Toxic epidermal necrosis: TEN) は重篤度が異なるが，同種の薬剤過敏症の病態と考えられており，前者は主に多型性紅斑の発現を特徴とするのに対し，後者は特にヘルペスウイルスの感染によって区別することができるといわれている (Auquier-Dunant *et al.*, 2002). スティーブンス-ジョンソン症候群では暗紫色斑上に小さな水疱が発現し，その変色範囲は体幹部全域にまで広がるが多い．また，水疱の程度が重度の部位では表皮の剥離がみられ，その範囲は最大で表皮全体の 10%にまで広がるとされている．一方，中毒性表皮剥離症では同様の皮膚の病斑を示すが，水疱の程度がより重篤で，一部では

ニコルスキー徴候 (Nikolski sign) を示し、皮膚に軽く摩擦を加えるだけで容易に皮膚の剥離が認められる。また、その剥離の範囲は表皮全体の 30%を超える とされている。いずれの薬剤過敏症を発症した患者も高熱を呈し、粘膜のびらんがほぼ全例で認められるといわれている (Bastuji-Garin *et al.*, 1993)。これらの薬剤過敏症では、表皮において T 細胞の浸潤が認められ、角化細胞の壊死やアポトーシスとの関連が報告されている (Viard *et al.*, 1998)。また、臨床症状として肝逸脱酵素の上昇を伴う肝炎（全例のおよそ 10%で認められる）や、皮膚と同様の上皮の剥離が消化管や肺に認められるといわれている。それぞれの致死率はスティーブンス-ジョンソン症候群の患者で 10%、中毒性表皮剥離症の患者では 30%を超え、主な死因は敗血症や肺障害とされている。

薬剤過敏症の免疫学的発症メカニズム

薬剤過敏症の発症メカニズムはほとんど明らかになっていないが、生体内の免疫系によって薬剤またはその代謝物が認識され、免疫反応によって臨床症状を発現するという考えが一般的となっている。即時型の IgE 介在性の薬剤過敏症は蕁麻疹や血管性浮腫、アナフィラキシーであるが、いずれも薬剤を服用してから数分から数時間以内に発症するといわれており、それらは薬剤またはその代謝物と肥満細胞上に結合した IgE との相互作用による血管作動性のメディエーターの放出が原因と考えられている (Brockow and Romano, 2008)。IgE 介在性の薬剤過敏症を誘発する薬剤として最もよく知られているのは抗生物質（特にペニシリン）や麻酔に関連した薬剤（局所麻酔剤など）である (Friedmann *et al.*, 2003; Gruchalla and Pirmohamed, 2006; Thyssen *et al.*, 2008)。これらの薬剤過敏症を発症した複数の患者では薬剤や代謝物の様々な化学構造の一部に対して反応する IgE の産生が確認されている。例えばペニシリンの例では一

部の患者では側鎖のメチレン基を認識する IgE が認められるのに対して、アミド基や β -ラクタム環の一部を認識する IgE をもつ患者も報告されている (Zhao *et al.*, 2001; Baldo *et al.*, 2008). これらの IgE 介在性の薬剤過敏症の発症はある程度予測可能であり、その病態生理はよく理解されていることから治療法も確立されている (Buchmiller and Khan, 2007; Sheikh *et al.*, 2008).

一方、皮膚以外にも、肝臓や腎臓、肺など様々な組織/器官が障害を受ける重篤な薬剤過敏症は遅延型であることが多く、一般的には服用を開始してから 7~10 日後に発症するといわれている (Rieder, 1994; Naisbitt *et al.*, 2003; Pichler, 2003; Uetrecht, 2008). この場合、原因薬剤の服用を中止しても臨床症状は進行することが多く、これらの症状の消失には数日から数週間が必要とされている. 遅発型の薬剤過敏症を発症した患者では薬剤特異的 T 細胞の存在が確認されており、この T 細胞が原因薬剤の刺激によってサイトカイン産生や細胞傷害性を示すことが報告されている. これらの反応においては薬剤特異的な CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞が T 細胞受容体を介して薬剤によって刺激を受けていると考えられているが、古典的な免疫学の概念では薬剤などの低分子は抗原とならず、直接的に未感作のナイーブ T 細胞を惹起させ免疫反応を誘導することとはできないとされている (Landsteiner and Jacobs, 1935). よって、薬剤が T 細胞を刺激し得る方法としてハプテン仮説が提唱されている (Schnyder *et al.*, 1997; Zanni *et al.*, 1998; Pichler, 2002; Schmid *et al.*, 2006). ハプテン仮説では薬剤または薬剤代謝によって生成する化学的反応性の高い代謝物 (以下、反応性代謝物) がハプテンとなり内因性のタンパクに共有結合し、このハプテン-タンパク複合体が抗原プロセッシングと抗原提示を介して免疫反応を惹起すると想定されている. よって、ハプテンは自然免疫系を刺激する作用 (免疫原性) と獲得免疫系にとって新規の抗原になる性質 (抗原性) を持ち合わせていると考

えられる。これらの低分子化合物に対する免疫反応についてはこのハプテン仮説によって説明が可能であり、*p*-フェニレンジアミンなどの化学物質についてはすでに実証されている (Griem *et al.*, 1998; Aiba *et al.*, 2003)。

薬剤過敏症における薬剤代謝と解毒機構

ペニシリンやセファロスポリンといった抗生物質、カプトプリルといった高血圧薬などは他の分子と直接、共有結合する化学反応性を有しており、多くの場合タンパクと結合し抗原性を獲得することが知られている (Park *et al.*, 1992; Merk and Hertl, 1996; Uetrecht, 2006)。ペニシリンやセファロスポリンはβ-ラクタム環構造を有し、その構造が自然開環してタンパクのリシン残基に直接的に反応し、抗原形成していると考えられている (Levine and Ovary, 1961; Parker, 1982; Park and Kitteringham, 1990)。また、カプトプリルは構造内のチオール基がタンパクのシステイン残基と共有結合し、抗原形成していると考えられている (Park *et al.*, 1982)。これらは古典的な感作性化学物質であるジニトロクロロベンゼンやジニトロフルオロベンゼンが主としてリシン残基やシステイン残基を介してタンパクと直接的に結合するのと同様である (Knight and Green, 1979)。一方、他の薬剤がタンパクと結合する場合には代謝または活性化によって反応性代謝物が生成されることが必須と考えられている (Naisbitt *et al.*, 2000)。エポキシドやキノン、ニトロソ誘導体、ハロゲン化アシルが典型的な反応性代謝物であり、いずれも抗原形成に寄与していると考えられている (Park *et al.*, 1998)。薬剤代謝は第一相反応と第二相反応とからなるが、反応性代謝物は多くの場合、第一相反応によって生成するとされている。第一相反応では通常、酸化反応によって水溶性の代謝物が生成され、第二相反応では第一相反応で生成した代謝物から抱合体 (グルタチオン抱合体やグルクロン酸抱合

体) が生成する. 第一相反応の本来の生理学的意義は薬剤を水溶性の代謝物に変換することによって体外に排出しやすく変換することであるが, 特定の薬剤の場合, 前述のようなタンパクに結合する求電子性の代謝物が生成されることになる. 第一相反応を触媒する主要な酵素であるシトクローム P450 は肝臓に最も多く存在するが, 他にも皮膚や消化管, 腎臓といった複数の組織/器官や量は少ないものの末梢に存在する一部の免疫細胞でも認められており, このことが組織/器官に特異的な薬剤過敏症反応が誘発される原因とされている (Kao and Carver, 1990; Uetrecht, 1992; Pirmohamed *et al.*, 1994; Gonzalez, 1998; Wynn and Meiller, 1998). 反応性代謝物は様々なタンパクと結合し抗原となるだけでなく, 代謝やシグナル経路を機能的に阻害することから, 解毒機構が機能しない場合, 細胞内において何らかの毒性が惹起され得ると考えられる (Guengerich, 1990). 通常, 正常な個体では反応性代謝物が生成しても, 肝臓では第二相反応によって, また肝細胞以外の細胞でも細胞内に存在する最も豊富な抗酸化物質であるグルタチオンや他の解毒酵素の作用によって解毒されていると考えられている (Mills and Lang, 1996; Brockmoller *et al.*, 1998; de Wildt *et al.*, 1999; Salinas and Wong, 1999). しかし, 感染や他の薬剤療法, 免疫系の制御異常によって反応性代謝物の生成が亢進または解毒機構が抑制されることが報告されている (Uetrecht, 1989; Pirmohamed *et al.*, 1992; Rieder, 1994; Carr and Cooper, 1995; Cribb *et al.*, 1996). また, 反応性代謝物の生成が肝臓ではなく, 例えば皮膚の角化細胞や樹状細胞内で起こる場合, それらの解毒機構はほとんど存在しないことが報告されている (Kimber and Cumberbatch, 1992; Reilly *et al.*, 2000; Janmohamed *et al.*, 2001; Swanson, 2004; Roychowdhury and Svensson, 2005). このように薬剤の代謝活性化と解毒化の不均衡や解毒化プロセスの障害によっても薬剤過敏症の感受性が高まると考え

られており、薬剤過敏症の発症の有無を決定する素因として薬剤の代謝活性化だけでなく、薬剤の細胞内での解毒機構も重要であると考えられている。

医薬品開発における薬剤過敏症の発現リスク予測

不運にも臨床現場において薬剤過敏症反応がみられるのは薬剤が上市されてからのことが多く、場合によっては多くの患者に使用された後に初めて顕在化することもある (Olson *et al.*, 2000). このような新薬による市販後の重篤な副作用の発現は患者に対して過大な損害を与えるだけでなく、企業も経済的な損失を被ることになる (Ratajczak, 2004). しかし、医薬品開発において実施される従来の Sprague Dawley (SD) ラットなどの実験動物を用いた毒性試験では患者での薬剤過敏症の発現リスクを予測することができない場合がほとんどであり (Bala *et al.*, 2005; Descotes, 2006), このリスクを予測し得る試験系の開発が新薬を市場に届ける製薬企業にとって急務の課題となっている。

これまでにいくつかのモデルが開発され試されてきたが、それらは予測性が低いか、または経口投与される薬剤により引き起こされる薬剤過敏症反応とは異なる機序に基づいているものであり、有用性の低いものであった。モルモットやマウスを用いて開発された抗原性試験は薬剤によって誘導される生体内での抗体産生反応の有無を検討するために用いられてきた。しかしながら、この試験法では経口投与される薬剤のほとんどが抗体産生を誘導せず、患者で薬剤過敏症を発現する薬剤ですらその結果は同様であることが示されている (Weaver *et al.*, 2003). 他にも患者で薬剤過敏症を引き起こす薬剤のフェニトイン (phenytoin: PHT) や他の化合物を動物の足蹠に皮下投与すると膝窩リンパ節の腫脹がみられるという知見から膝窩リンパ節試験という試験法が開発されたが (Gleichmann, 1981; Pieters and Albers, 1999), 経口投与される薬剤の多く

は薬剤過敏症反応の誘導に代謝による活性化を必要とし、経口投与される薬剤を足蹠に皮下投与することは薬剤過敏症反応の発現機序の観点から妥当性に欠けると考えられる。

本研究の背景および目的

Brown Norway (BN) ラットは免疫介在性の有害反応を引き起こす様々な物質に対して感受性の高い系統のラットであり、これまでに化学物質誘発性の自己免疫病や食物誘発性のアレルギーの研究に多く用いられてきた (Pieters *et al.*, 2002; Knippels and Penninks, 2005)。これらの原因物質を BN ラットに投与すると糸球体腎炎、皮膚や肺の病態など、ヒトと同様の様々な病態を発症することが知られている。薬剤については D-ペニシラミン (D-penicillamine: D-Pen) やネビラピン (Nevirapine) といった患者で薬剤過敏症を発症させる薬剤が BN ラットでも皮疹を発症させることが示されている (Utrecht, 2005)。BN ラットにおけるこの症状は皮膚の炎症性細胞の浸潤を特徴とし、リンパ球の増殖や高イムノグロブリン血症を伴うものである。一方で、他の薬剤過敏症を発症させる薬剤が BN ラットにどのような影響をもたらすかについてはこれまでに報告がなされていない。

本研究では患者で薬剤過敏症を発症させることが知られている薬剤であるフェニトイン、カルバマゼピン (carbamazepine: CBZ)、アモキシシリン (amoxicillin: AMX)、スルファメトキサゾール (sulfamethoxazole: SMX) および薬剤過敏症の報告が少ない薬剤であるリドカイン (lidocaine: LDC) (Jackson *et al.*, 1994) を BN ラットに 28 日間経口投与し、BN ラットにおける皮疹の発現、血液学および組織学的変化の有無について調べた。まず BN ラットで皮疹を発症させることが知られている D-Pen を BN ラットおよび SD ラットに投

与し (Utrecht, 2005), その影響について調べた。その後, これらの被験薬の投与によりみられた変化と比較を行った。また, PHT および CBZ を SD ラットに 28 日間経口投与し, p-Pen, PHT および CBZ を BN ラットに, p-Pen を SD ラットに 28 日間経口投与した脾臓とともに, 免疫組織化学染色による脾臓の組織学的検査を実施した。さらに BN ラットについて末梢血および脾臓におけるリンパ球サブセット解析ならびに, 血漿中サイトカインマイクロアレイ解析を実施することにより, ヒトで薬剤過敏症を誘発する薬剤の投与によって惹起される免疫応答について検討した。

第二章

材料と方法

試験薬

D-penicillamine (D-Pen), phenytoin (PHT), carbamazepine (CBZ), amoxicillin (AMX), sulfamethoxazole (SMX) および lidocaine (LDC) はシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社から購入した。

動物および飼育

すべての動物実験操作は大日本住友製薬株式会社の動物実験審査委員会の承認を受けて実施した。Brown Norway ラットおよび Sprague Dawley ラットは日本チャールス・リバー株式会社（滋賀）から購入した。ラットは 5 週齢の雄動物を入荷し、飼育は実験に使用する前に飼育環境に馴化させるため 7 日間の馴化期間を設定した。温度、湿度、照明時間および喚起回数が制御された環境下において、前・床面ステンレス網、壁面アルミ・ステンレス製懸垂式ケージに 1 ケージあたり 1 または 2 匹ずつ収容し実施した。飲水はろ過処理した水道水を自動給水装置のノズルを介して自由に摂取させた。餌は照射滅菌済みのげっ歯類用のペレット状の固形飼料をアルミ製給餌器に入れて、自由に摂食させた。馴化期間終了後、一般状態や体重の推移から判断して状態の良い動物を選定し試験に使用した。投与開始前日に実施した各群への動物の割り付けは、馴化期間中の体重および体重増加量を指標にコンピューター・プログラムを用いた層別無作為割り付け法によって行い、各群の動物の体重の平均値に有意差がないようにした。また、投与開始日においても各群の動物の体重の平均値に有意差がないことを確認した。

試験デザイン

D-Pen を SD ラットに投与し、一般状態（皮膚症状を含む）、血液学的パラメー

ター、血清中 IgE 濃度への影響を調べた検討ならびに、D-Pen, PHT, CBZ, AMX, SMX および LDC を BN ラットに投与し、前述の検討に加え二次リンパ組織/器官への影響を調べた検討では、各薬剤について投与量を 2 用量設け、1 群 5 匹の動物を用いて試験を実施した。いずれの薬剤についても本試験を実施する前に予備試験を実施し、それらの試験に基づいて投与量を設定した。高用量は最大耐量を超えない用量で、且つ何からの反応がみられると予想される用量、低用量については D-Pen は高用量の 1/5, PHT および CBZ は高用量の約 2/3, AMX, SMX および LDC は高用量の 1/2 の用量になるように設定した。すなわち、各薬剤の高用量および低用量はそれぞれ D-Pen については 500, 100 mg/kg, PHT については 450, 300 mg/kg, CBZ については 500, 300 mg/kg, AMX については 1000, 500 mg/kg, SMX については 500, 250 mg/kg, LDC については 200, 100 mg/kg を設定した。いずれの薬剤も媒体である 0.5% メチルセルロース水溶液に懸濁または溶解させ、28 日間にわたり経口投与した。薬剤の 1 日投与容量は AMX, SMX および LDC については 5 mL/kg 体重とし、D-Pen, PHT および CBZ については 10 mL/kg 体重として週毎に測定する動物の体重値に基づき算出した。

一般状態については異常な外観や行動の有無を各動物について 1 日 2 回観察した。血液学的検査については動物を安楽死させる前日の午後 4 時頃から絶食させ、イソフルラン吸入麻酔下において腹部大動脈から採取した血液を用いて実施した。血清は採取した血液から調製し、IgE 測定を実施するまで超低温冷蔵庫にて冷凍保管した。組織学的検査については採血後、肉眼的検査を実施した後、動物から脾臓、腸間膜リンパ節及び小腸（パイエル版）を採取し、組織標本を作製して、光学顕微鏡検査を実施した。

D-Pen を BN ラットに投与し、投与量または投与期間と二次リンパ組織/器官の

胚中心過形成との関連を調べた検討では、1 群 5 匹の動物を用いて D-Pen を 30 mg/kg の投与量で 28 日間または 500 mg/kg の投与量で 7 日間投与し、投与終了後、先の検討と同様の組織学的検査を実施した。

D-Pen, PHT および CBZ を投与した SD ラットの二次リンパ組織/器官での胚中心過形成の発現を調べた検討では、1 群 5 匹の動物を用いて試験を実施した。

PHT および CBZ については先の BN ラットを用いた検討と同じ 2 用量を投与量で 28 日間投与し、投与終了後脾臓、腸間膜リンパ節及び小腸（パイエル版）を採取し、組織学的検査を実施した。D-Pen については先の検討で投与を終了した SD ラットの二次リンパ組織/器官を用いた。

脾臓を用いた免疫組織化学染色の検討では、D-Pen については 500 mg/kg, PHT については 450 mg/kg, CBZ については 500 mg/kg をそれぞれ BN ラットおよび SD ラットに 28 日間投与し作製した脾臓のパラフィンブロックを用いて実施した。

D-Pen, PHT および CBZ を BN ラットに投与した際のリンパ球サブセット解析および血漿中サイトカインマイクロアレイ解析では、1 群 3 匹の動物を用いて試験を実施した。D-Pen については 500 mg/kg, PHT については 450 mg/kg, CBZ については 500 mg/kg の投与量で、7 または 28 日間にわたり投与した後、解析を実施した。リンパ球サブセット解析では末梢血については投与後 1, 3, 7 および 28 日の時点で頸静脈より血液を採取し、脾臓についてはイソフルラン吸入麻酔下において腹部大動脈から血液を採取した後、脾臓を採取し、単細胞浮遊液を調製して実施した。なお、脾臓については細胞懸濁液を調製する前に脾重量を測定した。血漿中サイトカインマイクロアレイ解析では投与後 7 および 28 日の時点で腹部大動脈から採取した血液から血漿を調製して実施した。

皮膚症状の定義

本研究においてみられた皮膚症状の定義とその説明を以下に示す.

潮紅：耳介，尾，足底や可視粘膜が赤色化しているもの．腫脹：局所が腫れ上がっているもの．創傷：皮膚が裂け損傷しているもの．

血液学的検査

白血球数，好中球数，単球数，好酸球数，好塩基球数および大型非染色球数を検査機器である ADVIA 120 Hematology System (シーメンス ヘルスケア ダイアグノスティックス マニュファクチュアリング リミテッド) を用いて測定した．血清中 IgE 濃度については市販の ELISA キット (株式会社シバヤギ) を用いて測定した．

組織標本の作製

動物から脾臓，腸間膜リンパ節及び小腸 (パイエル板) を採取し，10%中性ホルマリン液中にて固定させ，その後パラフィンワックスに包埋し，パラフィンブロックを作製した．ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施した組織標本については，薄切後，HE 染色を施し作製した．免疫組織化学染色を施した組織標本については，薄切後，1 次抗体として抗 CD3 (ダコ・ジャパン株式会社) または抗 B 細胞抗体 (BMA Biomedicals AG)，2 次抗体として酵素標識ポリマー試薬であるシンプルスステインラット MAX-PO (MULTI) (株式会社ニチレイバイオサイエンス) を用いた染色を施し作製した．

組織学的検査における評価方法

組織所見はその程度について，その数や大きさ，分布に基づいて 0～3 のスコア

付けを行った。胚中心については小リンパ球が密集して暗く見える濾胞領域に囲まれ、明るく見える球形の領域を胚中心と定義し、胚中心過形成のスコア付けについては以下の方法で実施した。第一の判定基準として顕微鏡の視野内の数を用い、第二の判定基準としてその大きさを用いた。実際の判定基準は以下のとおりとした。スコア 0：胚中心の数は 2～3 個、大きさは標準（対照動物と同程度）。スコア 1：胚中心の数は 4～10 個、そのうちのいくつかは標準よりやや大きい。スコア 2：胚中心の数は 11～20 個、そのうちの多くは標準より明らかに大きい。スコア 3：胚中心の数は 21～30 個、そのうちの大多数は標準より明らかに大きい。

血漿中サイトカインマイクロアレイ解析

血漿から抽出したタンパクをビオチン化して 24 種類のサイトカイン（CCL2, CCL3, CCL20, CCR4, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4, FasL, GM-CSF, IFN γ , IP-10, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12/IL-23 p40, IL-13, MIF, TGF- β 1, TNF α ）に対する特異的な抗体を搭載したマイクロアレイ上加えた後、蛍光標識ストレプトアビジンを用いて検出した。マイクロアレイについては GenePix®4000B（モレキュラーデバイス ジャパン株式会社）を用いて蛍光発光画像を読み取り、Array-Pro Analyzer®（株式会社日本ローパー）にて、データを数値化した。データは信頼性が低いものはカットオフを行うとともに、アレイ間の陽性対照のシグナル比が 1:1 になるように補正を行った。

フローサイトメーターを用いたリンパ球サブセット解析

溶血処理した末梢血または脾細胞から単細胞浮遊液を調製し、1 ウエルあたり 1

×10⁶細胞を播種し、FITC, PE, PE-Cy5.5 または APC 標識の抗 CD3, 抗 CD4 抗 CD8, 抗 CD25 または抗 CD45RA 抗体（いずれも日本ベクトン・デッキンソン株式会社より購入した）と氷上で 30 分間染色した後，フローサイトメーター（日本ベクトン・デッキンソン株式会社）を用いて解析を実施した．細胞内の Foxp3 の発現量の評価の際には，まず細胞を抗 CD3, 抗 CD4 および抗 CD25 抗体を用いて染色した後，Foxp3 検出キット（日本ベクトン・デッキンソン株式会社）に同封されている緩衝液を用いて固定，透過処理した．その後に抗 Foxp3 抗体を用いて染色し，フローサイトメーターを用いて解析を実施した．

統計解析

血液学的検査，血清中 IgE 測定およびリンパ球サブセット解析で得られたデータについては，平均値および標準偏差を算出した．血液学的検査および血清中 IgE 測定で得られたデータについては Bartlett の検定により分散の均一性を検定した後（有意水準：5%），等分散の場合は Dunnett の多重比較検定，不等分散の場合は Steel の多重検定比較により，統計解析を実施した．リンパ球サブセット解析で得られたデータについては Student の t 検定により媒体対照群との比較を両側，有意水準 5%または 10%で検定した．

第三章

結果

第一節 D-Pen 投与による皮膚症状の発現は SD ラットでは発現せず、BN ラットでのみ発現する

本研究ではまず、D-Pen を BN ラットに投与することによって Utrecht らによって報告されているような皮膚症状が再現されるかを確認した(Utrecht, 2005). 報告では飲水投与で投与した場合に皮膚症状が発現するとされていたが、本研究では以降の検討で使用する他の薬剤が水に溶解しないことを考慮して、飲水投与ではなく懸濁液による投与が可能な強制経口投与による投与方法を用いた. 予備試験の結果から本研究における D-Pen の投与量は 100 および 500 mg/kg とし、28 日間にわたり投与した. また本検討に合わせて、医薬品開発において通常の毒性試験で使用する系統のラットである SD ラットに同様の方法で D-Pen を投与し、これらの動物で皮膚症状が発現するかについても検討した.

図 1 に示すように、薬剤過敏症様の皮膚症状が D-Pen を 100 または 500 mg/kg 投与した BN ラットにおいてみられた. これらの動物では潮紅や腫脹といった症状が投与後 2 週間頃から投与期間終了時まで例数は変化するものの継続してみられた. これらの症状の発現は 100 mg/kg の投与量の動物よりも、500 mg/kg の投与量の動物で先行して発現した. また、薬剤過敏症との関連は不明ではあるが、創傷が一過性に 500 mg/kg 投与の 1 例でみられた. これらの症状に加え、失調性歩行が 500 mg/kg 投与の数例で投与期間中に散見された（データは示さず）. 一方、これらの皮膚症状は D-Pen を投与した SD ラットではいずれの投与量の動物にもみられなかった.

次にこれらの皮膚症状がみられた BN ラットの血液学的検査および血清中 IgE 濃度測定を実施し、皮膚症状との関連について検討した. 表 1 に示すように、D-Pen を投与した BN ラットでは白血球数、好中球数および好酸球数の高値変化

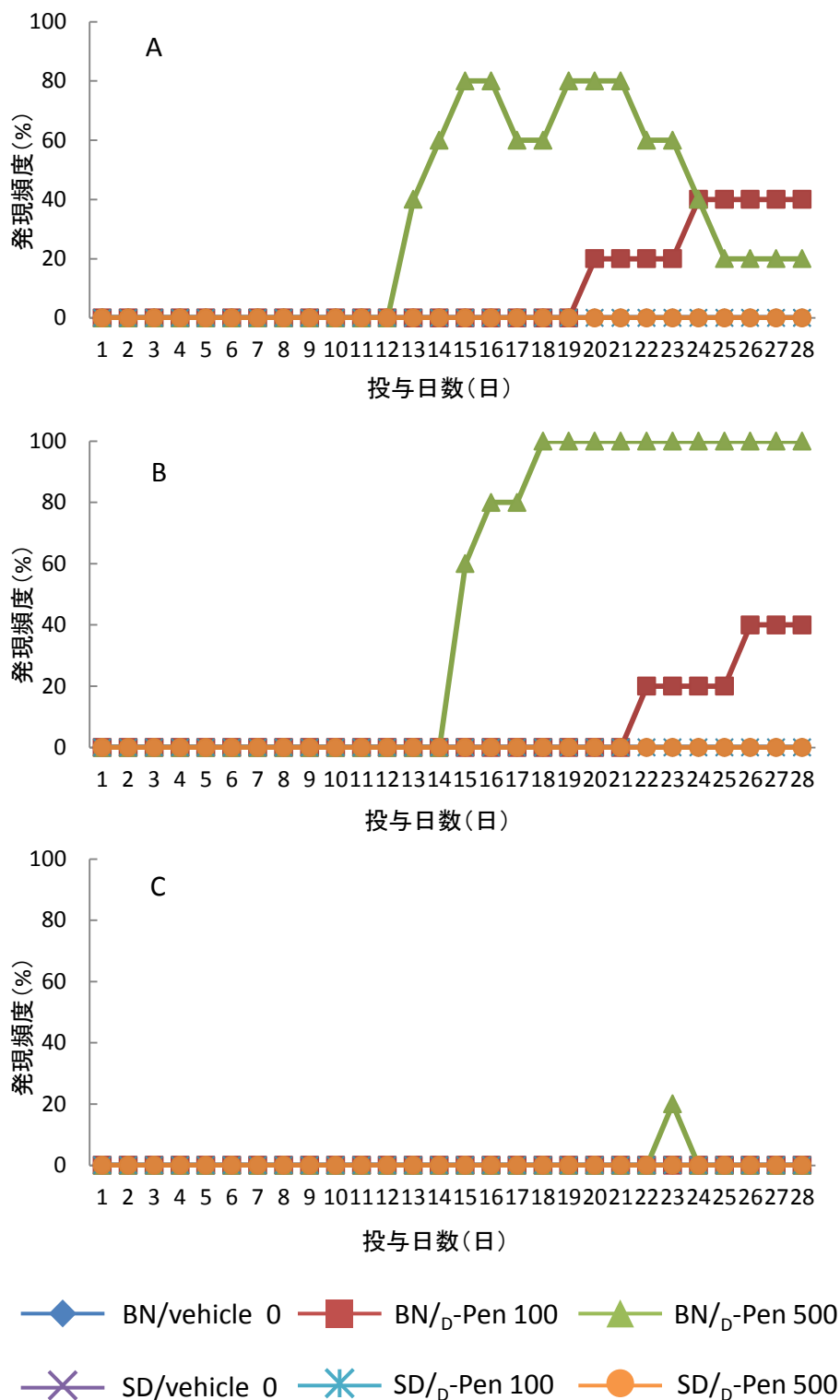


図1 BNラットおよびSDラットに_D-Penを投与した際の皮膚症状の発現頻度(%)

BNラットまたはSDラット (n = 5/群) に媒体または_D-Penを100、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与し、毎日一般状態の観察を実施して、(A)潮紅、(B)腫脹および(C)創傷の発現を記録した。データは各投与日における症状の群毎の発現頻度(%)を示す。

表1 BNラットに_D-Penを投与した際の血液学的パラメーターへの影響

	投与量 (mg/kg/day)	白血球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好中球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	単球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好酸球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Vehicle	0	4.74 \pm 0.446	0.36 \pm 0.007	0.11 \pm 0.036	0.10 \pm 0.021
_D -Pen	100	14.59 \pm 21.821	4.60 \pm 9.390	0.40 \pm 0.655	1.35 \pm 2.674
_D -Pen	500	6.82* \pm 1.943	1.99* \pm 0.645	0.24 \pm 0.162	0.45* \pm 0.257

	投与量 (mg/kg/day)	好塩基球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	リンパ球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	大型非染色球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	血清中IgE濃度 (ng/mL)
Vehicle	0	0.00 \pm 0.005	4.13 \pm 0.419	0.03 \pm 0.011	402.3 \pm 218.1
_D -Pen	100	0.06 \pm 0.114	8.00 \pm 8.678	0.19 \pm 0.347	6003.6** \pm 1956.5
_D -Pen	500	0.01 \pm 0.008	4.07 \pm 1.509	0.06 \pm 0.036	34552.7** \pm 12123.2

BNラット(n = 5/群)に媒体または_D-Penを100、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、血液学的検査および血清中IgE濃度測定を実施し、白血球数、好中球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、リンパ球数、大型非染色球数および血清中IgE濃度への影響を調べた。データは平均値 \pm 標準偏差を示す。

*、**有意差あり、それぞれ $p < 0.05$ 、 0.01

がみられた。これらの変化は 500 mg/kg 投与の動物では統計学的有意差がみられたが、100 mg/kg 投与の動物ではなかった。これらの血液学的パラメーターの変化に加え、100 mg/kg 投与の動物では統計学的有意差はないものの単球数、好塩基球数、リンパ球数および大型非染色球数の高値変化がみられた。また、血清中 IgE 濃度については 100 および 500 mg/kg 投与のいずれの動物でも統計学的に有意な高値がみられ、その程度は 500 mg/kg 投与の動物でより高い傾向にあった。一方、表 2 に示すように、皮膚症状がみられなかった SD のラットにおいても、100 mg/kg 投与の動物では血液学的パラメーターに変化はみられなかったが、500 mg/kg 投与の動物において好中球数および単球数の統計学的に有意な高値がみられるとともに、統計学的有意差はないものの大型非染色球数の高値変化がみられた。さらに血清中 IgE 濃度についても 500 mg/kg 投与の動物において統計学的に有意な高値がみられた。これらの結果から D-Pen 投与による皮膚症状の発現は BN ラットでのみ発現することが示され、皮膚症状の発現と血中の炎症性細胞や IgE の変化は関連しない可能性が示唆された。

第二節 PHT および CBZ を投与した BN ラットでは皮膚症状は発現しないが、

D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは共通して二次リンパ組織/器官に胚中心過形成がみられる

D-Pen 以外の薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤を投与した場合の BN ラットへの影響について検討する目的で、患者で薬剤過敏症の発現が報告されている PHT および CBZ を BN ラットに 28 日間にわたり投与した。PHT は 300 または 450 mg/kg の投与量で、CBZ を 300 または 500 mg/kg の投与量でそれぞれ投与した。

図 2 に示すように、これらの動物では D-Pen 投与時にみられた薬剤過敏症様の

表2 SDラットに_D-Penを投与した際の血液学的パラメーターへの影響

	投与量 (mg/kg/day)	白血球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好中球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	単球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好酸球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Vehicle	0	8.16 \pm 1.875	1.31 \pm 0.421	0.19 \pm 0.073	0.06 \pm 0.034
_D -Pen	100	7.09 \pm 0.469	1.28 \pm 0.810	0.15 \pm 0.065	0.05 \pm 0.013
_D -Pen	500	8.64 \pm 1.191	2.80* \pm 1.136	0.36* \pm 0.097	0.08 \pm 0.029

	投与量 (mg/kg/day)	好塩基球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	リンパ球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	大型非染色球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	血清中IgE濃度 (ng/mL)
Vehicle	0	0.02 \pm 0.005	6.52 \pm 1.697	0.05 \pm 0.021	92.5 \pm 153.9
_D -Pen	100	0.01 \pm 0.000	5.56 \pm 0.844	0.05 \pm 0.004	56.2 \pm 17.6
_D -Pen	500	0.01 \pm 0.007	5.28 \pm 0.342	0.11 \pm 0.038	1023.6* \pm 1468.6

SDラット(n = 5/群)に媒体または_D-Penを100、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、血液学的検査および血清中IgE濃度測定を実施し、白血球数、好中球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、リンパ球数、大型非染色球数および血清中IgE濃度への影響を調べた。データは平均値 \pm 標準偏差を示す。

*有意差あり、 $p < 0.05$

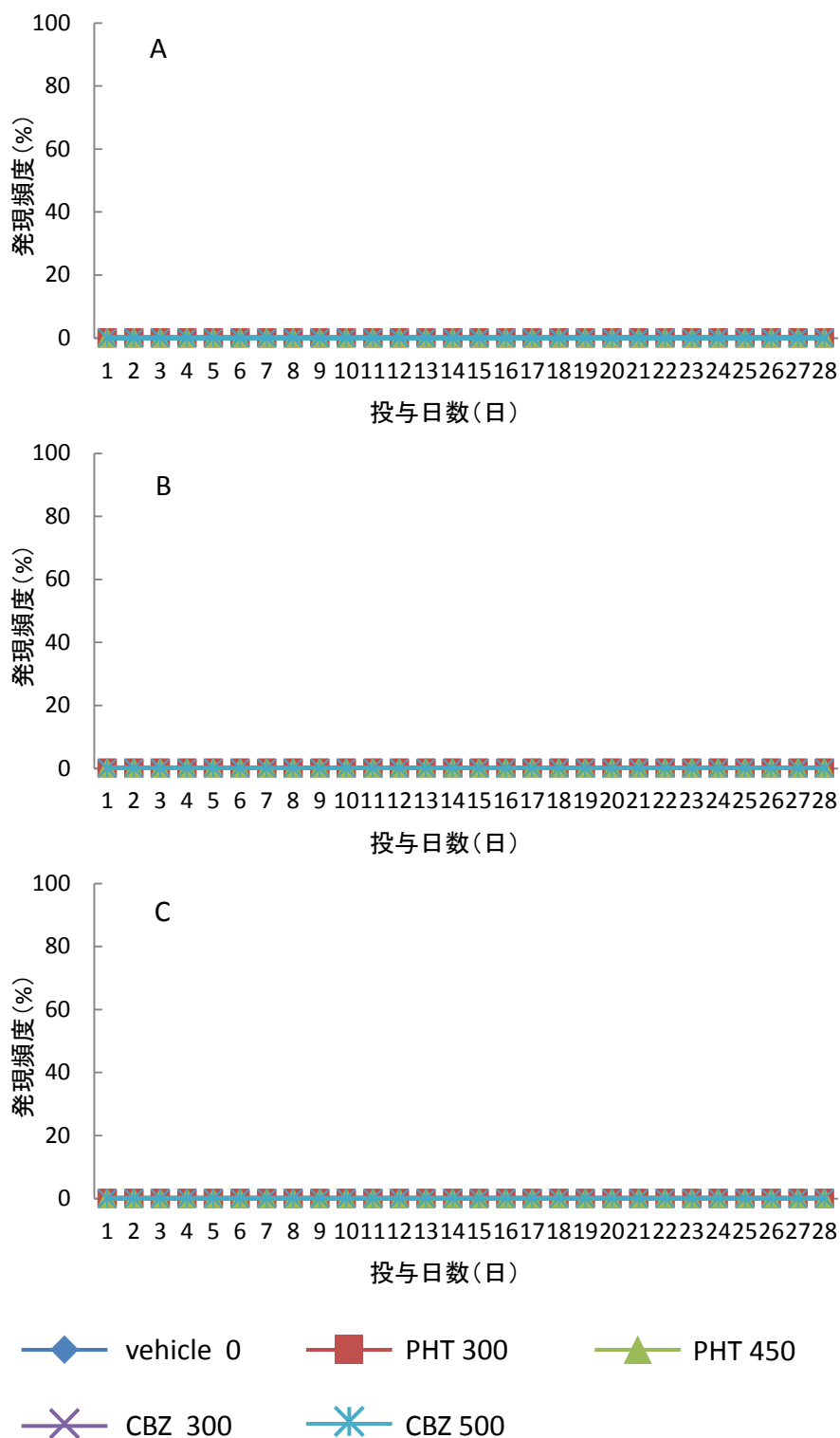


図2 BNラットにPHTおよびCBZを投与した際の皮膚症状の発現頻度(%)

BNラット(n = 5/群)に媒体またはPHTを300、450 mg/kgの各用量、CBZを300、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与し、毎日一般状態の観察を実施して、(A)潮紅、(B)腫脹および(C)創傷の発現を記録した。データは各投与日における症状の群毎の発現頻度(%)を示す。

皮膚症状は各薬剤のいずれの投与量の動物においてもみられなかった。

次に D-Pen 投与時と同様に血液学的検査および血清中 IgE 濃度測定を実施した。表 3 に示すように PHT を投与した動物ではいずれの投与量の動物においても血液学的パラメーターの高値変化はみられなかったが、CBZ を 500 mg/kg の投与量で投与した動物では単球数の統計学的に有意な高値、ならびに統計学的有意差はないものの白血球数およびリンパ球数の高値傾向がみられた。また、血清中 IgE 濃度については PHT を投与した動物ではいずれの投与量においても統計学的に有意な変化はみられなかったが、CBZ を投与した動物において 300 および 500 mg/kg 投与のいずれの動物でも統計学的に有意な高値がみられ、特に 500 mg/kg 投与の動物における IgE 濃度は皮膚症状のみられた D-Pen を 100 mg/kg の投与量で投与した BN ラットと同程度であった。これらの結果から PHT および CBZ 投与では BN ラットで皮膚症状は発現しないことが示され、D-Pen を投与した SD ラットのように、血中の炎症性細胞や IgE 濃度の変化がみられても皮膚症状は発現しないことが確認された。

次に D-Pen と CBZ を投与した BN ラットにおける血液学的パラメーターおよび血清中 IgE 濃度の変化には類似性がみられたことから、PHT を投与した動物を含めこれらの動物の二次リンパ組織/器官について組織学的検査を実施し、これらの動物において組織学的に共通した変化がないかについて検討した。本検討における二次リンパ組織/器官としては脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板を選じた。解剖時の肉眼的検査では D-Pen を投与した動物において脾臓の大型化、PHT および CBZ を投与した動物においてパイエル板の大型化がみられた（データは示さず）。組織学的検査では、D-Pen を投与した動物ではいずれの投与量の動物においても髄外造血が脾臓でみられた他に、胚中心過形成が脾臓および腸間膜リンパ節においてみられた（図 3、表 4）。髄外造血は 500 mg/kg を投与し

表3 BNラットにPHTおよびCBZを投与した際の血液学的パラメーターへの影響

	投与量 (mg/kg/day)	白血球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好中球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	単球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好酸球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Vehicle	0	3.75 \pm 0.629	0.40 \pm 0.223	0.07 \pm 0.012	0.09 \pm 0.054
PHT	300	3.49 \pm 0.275	0.33 \pm 0.077	0.08 \pm 0.032	0.11 \pm 0.063
PHT	450	3.08 \pm 1.029	0.19 \pm 0.057	0.06 \pm 0.024	0.10 \pm 0.091
CBZ	300	3.75 \pm 0.695	0.35 \pm 0.182	0.07 \pm 0.028	0.04 \pm 0.033
CBZ	500	5.02 \pm 1.522	0.40 \pm 0.201	0.10* \pm 0.007	0.04 \pm 0.014

	投与量 (mg/kg/day)	好塩基球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	リンパ球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	大型非染色球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	血清中IgE濃度 (ng/mL)
Vehicle	0	0.01 \pm 0.005	3.17 \pm 0.505	0.02 \pm 0.009	576.5 \pm 125.1
PHT	300	0.01 \pm 0.004	2.94 \pm 0.238	0.03 \pm 0.019	425.9 \pm 272.3
PHT	450	0.00 \pm 0.005	2.70 \pm 0.903	0.02 \pm 0.010	797.3 \pm 459.1
CBZ	300	0.00 \pm 0.004	3.27 \pm 0.510	0.02 \pm 0.005	2562.8* \pm 845.1
CBZ	500	0.01 \pm 0.005	4.44 \pm 1.310	0.03 \pm 0.023	4310.0* \pm 981.5

BNラット(n = 5/群)に媒体またはPHTを300、450 mg/kgの各用量、CBZを300、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、血液学的検査および血清中IgE濃度測定を実施し、白血球数、好中球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、リンパ球数、大型非染色球数および血清中IgE濃度への影響を調べた。データは平均値 \pm 標準偏差を示す。

*有意差あり、それぞれ $p < 0.05$

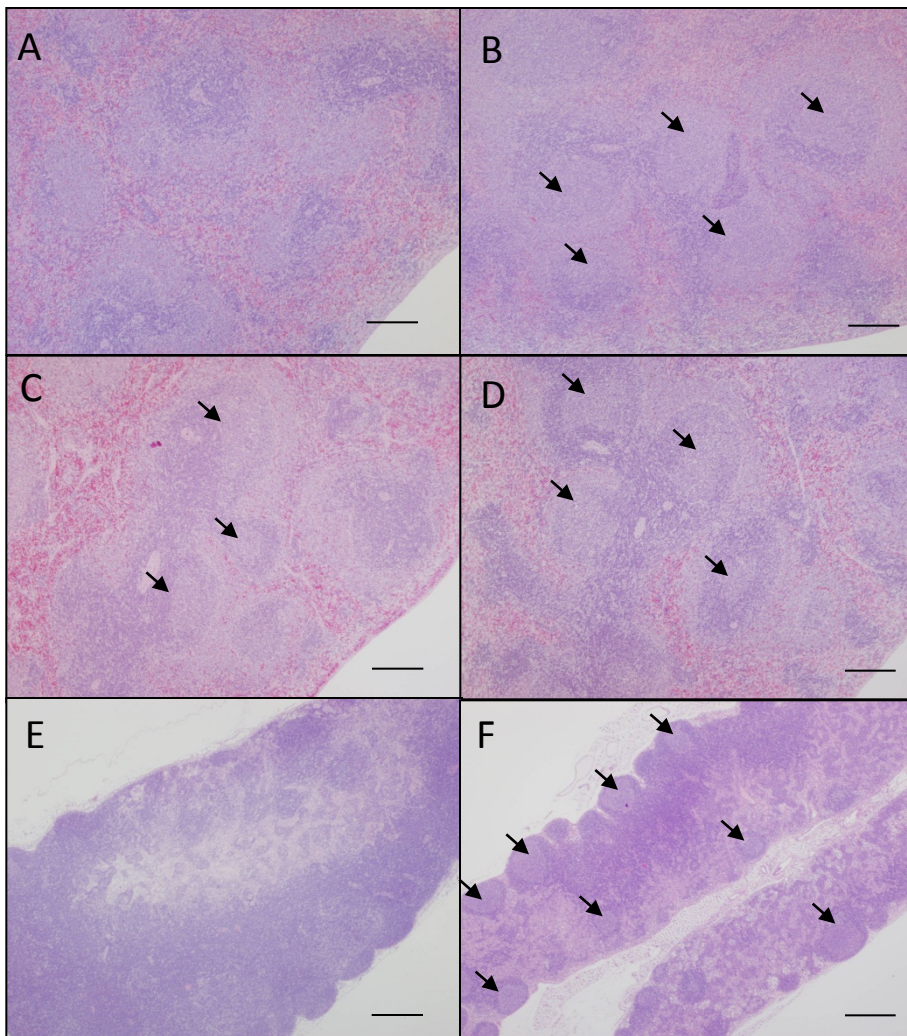


図3 BNラットに媒体、 D -Pen、PHTまたはCBZを投与した際の脾臓または腸間膜リンパ節

写真はBNラット($n = 5$ /群)に媒体(AおよびE)または D -Penを500 mg/kgの用量(BおよびF)、PHTを450 mg/kgの用量(C)、CBZを500 mg/kgの用量(D)で28日間にわたり投与した後に実施した組織学的検査でみられた脾臓(A-D)または腸間膜リンパ節(E、F)を示す。写真内の矢印は胚中心を示し、バーは0.5 mm(A-D)または1 mm(E、F)を示す。いずれの写真も5例の動物のうちの代表例を示す。

表4 BNラットに_D-Pen、PHTおよびCBZを投与した際の二次リンパ組織/器官への影響

組織/器官 所見	投与量 (mg/kg/day)	Vehicle	_D -Pen		PHT		CBZ	
		0	100	500	300	450	300	500
脾臓	スコア	(5)	(2)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
髄外造血	0	5	0	2	5	5	5	5
	1	0	1	1	0	0	0	0
	2	0	0	2	0	0	0	0
	3	0	1	0	0	0	0	0
胚中心過形成	0	5	1	0	4	3	2	0
	1	0	1	2	1	2	3	1
	2	0	0	3	0	0	0	4
	3	0	0	0	0	0	0	0
腸間膜リンパ節	スコア	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
胚中心過形成	0	5	0	0	5	5	5	5
	1	0	1	1	0	0	0	0
	2	0	4	4	0	0	0	0
パイエル板(小腸)		(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
異常なし		5	5	5	5	5	5	5

BNラット(n = 5/群)に媒体または_D-Penを100、500 mg/kgの各用量、PHTを300、450 mg/kgの各用量、CBZを300、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、組織学的検査を実施し、脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板への影響を調べた。カッコ内の数は検査した動物数を示し、みられた所見についてスコアを0～3に分類しその動物数を示した。また、所見がみられなかった場合は「異常なし」としてその動物数を示した。なお、スコア付けは材料と方法に記載した方法に従って実施した。

た動物よりも 100 mg/kg を投与した動物でその変化が強くみられた。胚中心過形成については脾臓では 500 mg/kg 投与の動物において 100 mg/kg 投与の動物よりもその変化が強くみられたが、腸間膜リンパ節では 500 mg/kg 投与と 100 mg/kg 投与の動物で変化に差はみられなかった。一方、PHT および CBZ を投与した動物でも脾臓で胚中心過形成がみられた（図 3，表 4）。いずれの薬剤も高用量投与の動物で低用量投与の動物よりもスコアが高い動物が多く存在し、その変化が強くみられた。なお、D-Pen、PHT または CBZ を投与したいずれの動物においても組織学的検査ではパイエル板に所見はみられなかった。また、脾臓および腸間膜リンパ節において濾胞過形成を示す像はみられなかった（図 3）。これらの結果から D-Pen、PHT および CBZ を投与した BN ラットでは共通して二次リンパ組織において胚中心過形成がみられることが示された。

第三節 BN ラットでは薬剤過敏症リスクの高い薬剤の投与でのみ胚中心過形成が発現する

次に薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤として、PHT および CBZ と同様に患者で薬剤過敏症の発現が報告されている AMX および SMX を用いて、これらを 28 日間にわたり BN ラットに投与し D-Pen や PHT、CBZ を投与した BN ラットと同様に、一般状態の観察、血液学的検査および血清中 IgE 濃度測定を実施するとともに、二次リンパ組織/器官における胚中心過形成がみられるかについて検討した。AMX は 500 または 1000 mg/kg の投与量で、SMX は 250 または 500 mg/kg の投与量でそれぞれ投与した。また患者での薬剤過敏症の発現リスクが低いとされている LDC を 100 または 200 mg/kg の投与量で同様に BN ラットに投与した。

図 4，5 に示すように、薬剤過敏症様の症状は AMX、SMX および LDC を投与

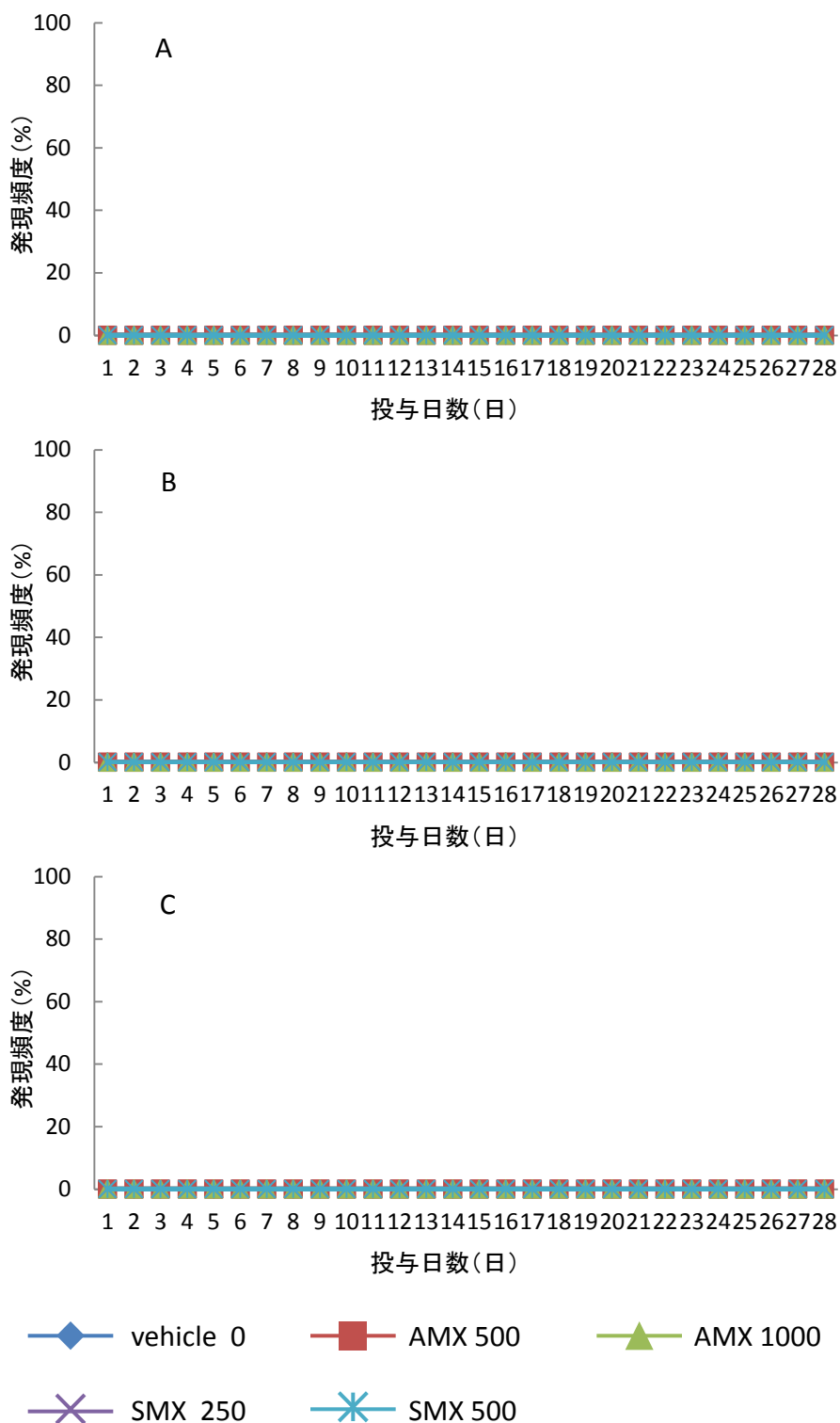


図4 BNラットにAMXおよびSMXを投与した際の皮膚症状の発現頻度(%)

BNラット(n = 5/群)に媒体またはAMXを500、1000 mg/kgの各用量、SMXを250、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与し、毎日一般状態の観察を実施して、(A)潮紅、(B)腫脹および(C)創傷の発現を記録した。データは各投与日における各症状の群毎の発現頻度(%)を示す。

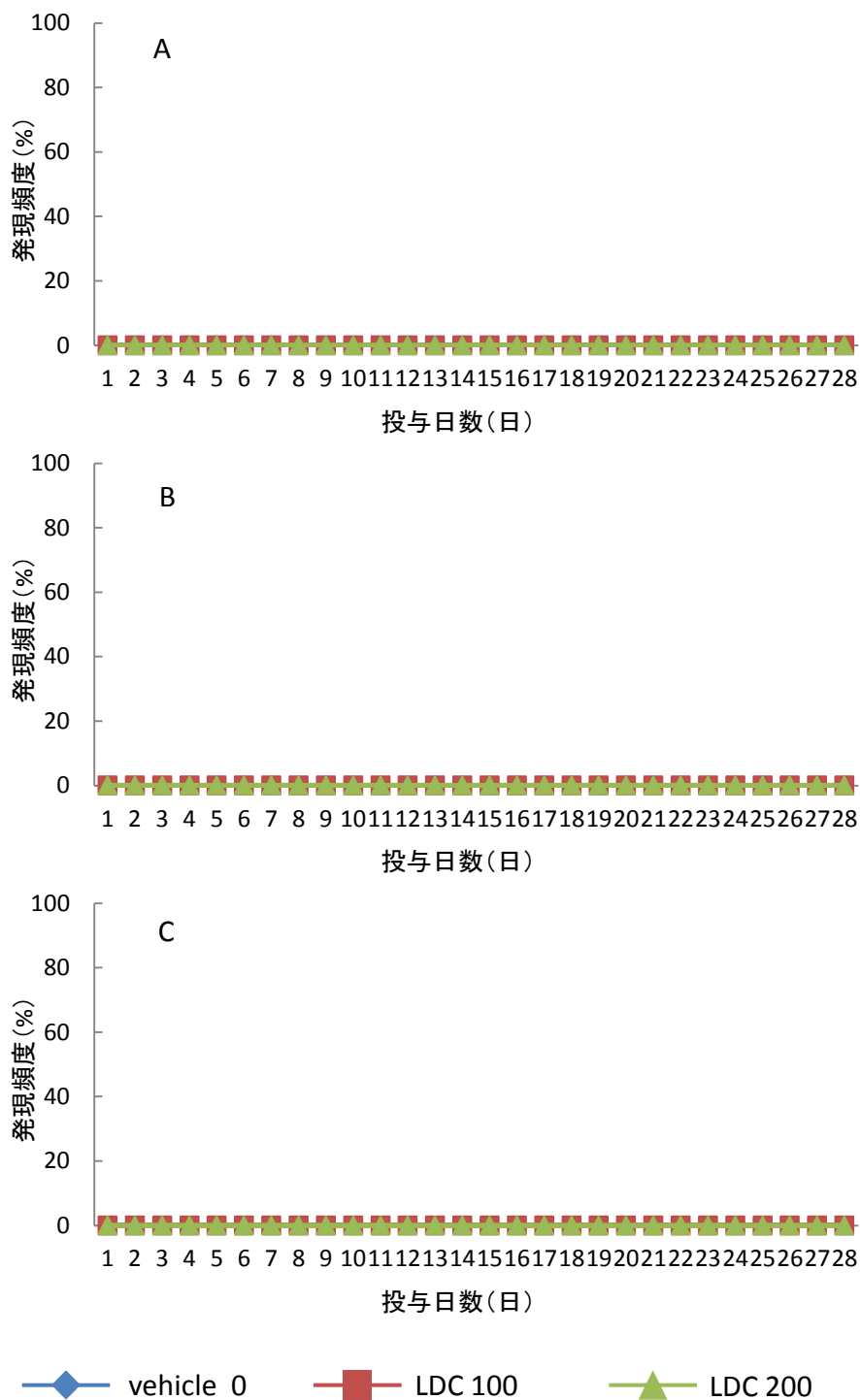


図5 BNラットにLDCを投与した際の皮膚症状の発現頻度(%)

BNラット(n = 5/群)に媒体またはLDCを100、200 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与し、毎日一般状態の観察を実施して、(A)潮紅、(B)腫脹および(C)創傷の発現を記録した。データは各投与日における症状の群毎の発現頻度(%)を示す。

した動物ではいずれの投与量の動物においてもみられなかった。

また、これらの動物について実施した血液学的検査、血清中 IgE 濃度測定では表 5 に示すように SMX を 500 mg/kg の投与量で投与した動物で統計学的に有意な好中球数の高値およびリンパ球数の低値がみられ、AMX を 1000 mg/kg の投与量で投与した動物および SMX を 250 mg/kg の投与量で投与した動物において統計学的有意差はないものの好中球数の高値変化がみられた。血清中 IgE 濃度については SMX を 500 mg/kg の投与量で投与した動物で統計学的に有意な高値がみられ、その値は D-Pen を 100 mg/kg 投与した動物や、CBZ を 500 mg/kg 投与した動物と同程度であった。一方、表 6 に示すように LDC を 200 mg/kg の投与量で投与した動物においては好塩基球の統計学的に有意な高値がみられ、100 および 200 mg/kg のいずれの投与量の動物においても統計学的有意差はないものの好酸球数およびリンパ球数の高値変化がみられた。なお、血清中 IgE 濃度についてはこれらの動物で高値変化はみられなかった。

次にこれらの動物の二次リンパ組織/器官について組織学的検査を実施した。解剖時の肉眼的検査では SMX を投与した動物において腸間膜リンパ節の大型化がみられた（データは示さず）。組織学的検査では、AMX を 1000 mg/kg の投与量で投与した動物の腸間膜リンパ節で、また SMX を投与したいずれの投与量の動物においても脾臓および腸間膜リンパ節に胚中心過形成がみられた（図 6, 表 7）。SMX を投与した動物でみられた胚中心過形成は、脾臓、腸間膜リンパ節とともに 500 mg/kg 投与の動物で変化が強くみられた。一方、LDC を投与した動物ではいずれの投与量の動物でも胚中心過形成はみられなかった。また、SMX を投与した動物ではいずれの投与量の動物においても傍皮質過形成がみられた。この他に、SMX を 250 mg/kg の投与量で投与した動物の 1 例の腸間膜リンパ節で好酸球浸潤がみられ、SMX を 500 mg/kg の投与量で投与した動物の 1 例の腸

表5 BNラットにAMXおよびSMXを投与した際の血液学的パラメーターへの影響

	投与量 (mg/kg/day)	白血球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好中球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	単球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	好酸球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Vehicle	0	7.55 \pm 2.118	0.48 \pm 0.179	0.12 \pm 0.074	0.12 \pm 0.054
AMX	500	6.65 \pm 1.029	0.47 \pm 0.172	0.09 \pm 0.043	0.08 \pm 0.080
AMX	1000	6.95 \pm 0.729	1.21 \pm 0.792	0.11 \pm 0.041	0.04 \pm 0.013
SMX	250	6.35 \pm 2.128	1.29 \pm 0.588	0.15 \pm 0.032	0.17 \pm 0.039
SMX	500	7.21 \pm 0.729	2.75** \pm 0.792	0.12 \pm 0.041	0.10 \pm 0.013

	投与量 (mg/kg/day)	好塩基球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	リンパ球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	大型非染色球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	血清中IgE濃度 (ng/mL)
Vehicle	0	0.03 \pm 0.021	6.74 \pm 1.833	0.06 \pm 0.042	889.9 \pm 956.0
AMX	500	0.03 \pm 0.005	5.93 \pm 1.054	0.05 \pm 0.021	242.8 \pm 60.9
AMX	1000	0.02 \pm 0.005	5.52 \pm 0.512	0.05 \pm 0.013	400.5 \pm 261.5
SMX	250	0.01 \pm 0.008	4.71 \pm 1.622	0.03 \pm 0.007	796.5 \pm 606.9
SMX	500	0.02 \pm 0.005	4.18* \pm 0.512	0.04 \pm 0.013	3515.0* \pm 1881.0

BNラット(n = 5/群)に媒体またはAMXを500、1000 mg/kgの各用量、SMXを250、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、血液学的検査および血清中IgE濃度測定を実施し、白血球数、好中球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、リンパ球数、大型非染色球数および血清中IgE濃度への影響を調べた。データは平均値 \pm 標準偏差を示す。

*, **有意差あり、それぞれ $p < 0.05$, 0.01

表6 BNラットにLDCを投与した際の血液学的パラメーターへの影響

	投与量 (mg/kg/day)	白血球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			好中球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			単球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			好酸球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)		
Vehicle	0	4.48	±	1.277	0.42	±	0.153	0.10	±	0.031	0.07	±	0.031
LDC	100	5.43	±	1.988	0.38	±	0.067	0.09	±	0.038	0.13	±	0.140
LDC	200	6.38	±	1.328	0.48	±	0.126	0.11	±	0.015	0.13	±	0.067

	投与量 (mg/kg/day)	好塩基球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			リンパ球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			大型非染色球数 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			血清中IgE濃度 (ng/mL)		
Vehicle	0	0.00	±	0.004	3.86	±	1.080	0.03	±	0.018	384.2	±	384.74
LDC	100	0.01	±	0.009	4.80	±	1.758	0.04	±	0.019	198.1	±	90.96
LDC	200	0.01*	±	0	5.62	±	1.170	0.04	±	0.016	226.3	±	74.11

BNラット(n = 5/群)に媒体またはLDCを100、200 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、血液学的検査および血清中IgE濃度測定を実施し、白血球数、好中球数、単球数、好酸球数、好塩基球数、リンパ球数、大型非染色球数および血清中IgE濃度への影響を調べた。データは平均値±標準偏差を示す。

*有意差あり、 $p < 0.05$

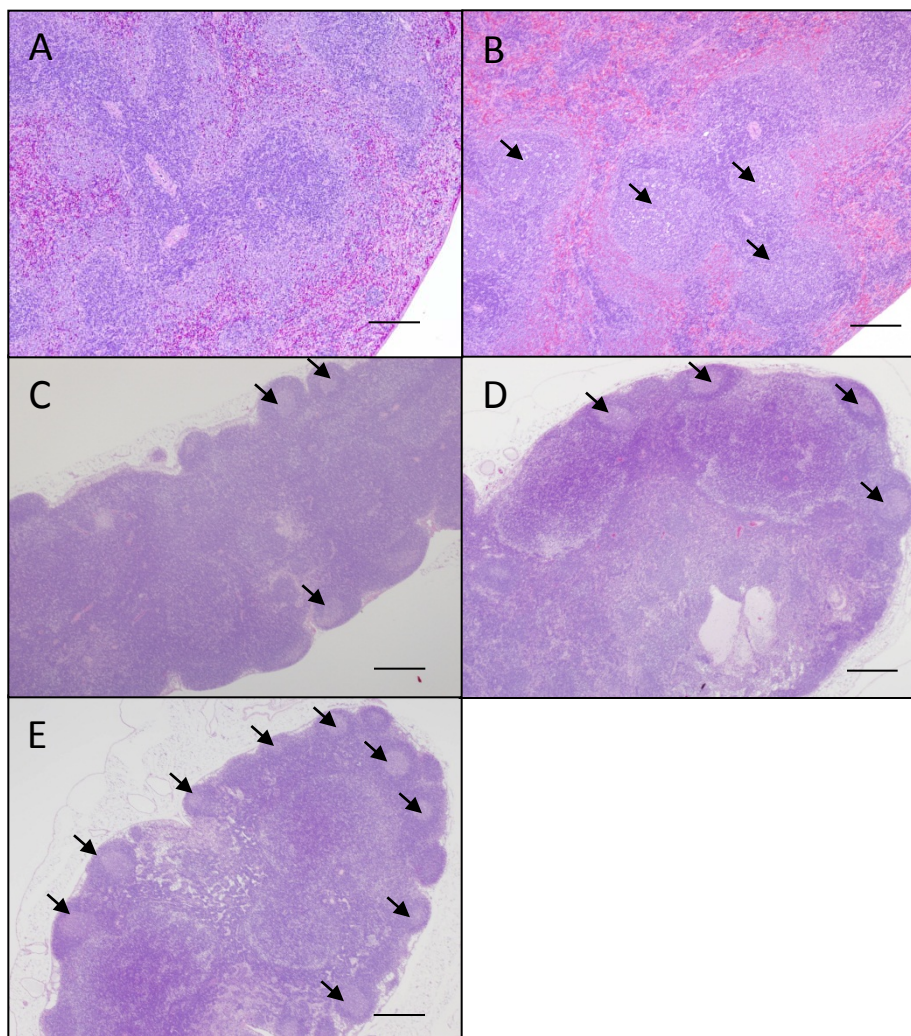


図6 BNラットに媒体、AMXまたはSMXを投与した際の脾臓または腸間膜リンパ節

写真はBNラット(n = 5/群)に媒体(AおよびC)またはSMXを500 mg/kgの用量(BおよびE)、AMXを1000 mg/kgの用量(D)で28日間にわたり投与した後に実施した組織学的検査でみられた脾臓(A、B)または腸間膜リンパ節(C-E)を示す。写真内の矢印は胚中心を示し、バーは0.5 mm(A、B)または1 mm(C-E)を示す。いずれの写真も5例の動物のうちの代表例を示す。

表7 BNラットにAMX、SMXおよびLDCを投与した際の二次リンパ組織/器官への影響

器官/組織 所見	投与量 (mg/kg/day)	Vehicle	AMX		SMX		LDC	
		0	500	1000	250	500	100	200
脾臓	スコア	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
胚中心過形成	0	5	5	5	3	0	5	5
	1	0	0	0	2	1	0	0
	2	0	0	0	0	3	0	0
	3	0	0	0	0	1	0	0
腸間膜リンパ節	スコア	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
好酸球浸潤	0	5	5	5	4	4	5	5
	1	0	0	0	1	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	0	0
肉芽腫性リンパ節炎	0	5	5	5	5	4	5	5
	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	0	0
胚中心過形成	0	5	5	3	2	2	5	5
	1	0	0	1	2	1	0	0
	2	0	0	1	1	2	0	0
傍皮質過形成	0	5	5	5	2	1	5	5
	1	0	0	0	1	3	0	0
	2	0	0	0	2	1	0	0
パイエル板(小腸)		(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
異常なし		5	5	5	5	5	5	5

BNラット(n = 5/群)に媒体またはAMXを500、1000 mg/kgの各用量、SMXを250、500 mg/kgの各用量、LDCを100、200 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、組織学的検査を実施し、脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板への影響を調べた。カッコ内の数は検査した動物数を示し、みられた所見についてスコアを0～3に分類しその動物数を示した。また、所見がみられなかった場合は「異常なし」としてその動物数を示した。なお、スコア付けは材料と方法に記載した方法に従って実施した。

間膜リンパ節で（好酸球性）肉芽腫性リンパ節炎がみられた．腸間膜リンパ節におけるこれらの炎症性変化については SMX を投与したいずれの投与量の動物においても回腸の粘膜固有層で好酸球浸潤がみられていることから（データは示さず），好酸球性腸炎との関連した変化である可能性が考えられた．なお，AMX, SMX または LDC を投与したいずれの動物においても組織学的検査ではパイエル板に所見はみられなかった．また，脾臓および腸間膜リンパ節において濾胞過形成を示す像はみられなかった（図 6）．これらの結果から薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤を投与した BN ラットでのみ二次リンパ組織において胚中心過形成がみられることが示され，リスクが低い薬剤を投与した場合では胚中心過形成はみられないことが示された．

第四節 D-Pen 投与による BN ラットでの胚中心過形成には一定の投与量と投与期間が必要である

T 細胞介在性の薬剤過敏症では一定の投与量と投与期間が必要なことが示されている．そこで BN ラットに D-Pen を低用量（30 mg/kg）で 28 日間投与または 500 mg/kg の投与量で短期間（7 日間）投与し，胚中心過形成がみられるかを検討した．これらの動物ではいずれの動物にも脾臓または腸間膜リンパ節に胚中心過形成はみられなかった（データは示さず）．

第五節 薬剤過敏症リスクの高い一部の薬剤は SD ラットでも胚中心過形成を発現させる

薬剤過敏症は一部の患者でのみ発症し，特定の人種や遺伝的背景をもつ患者でその発症率が高いことが報告されている．そこで，BN ラットでみられた薬剤投与によって発現する胚中心過形成が同ラットに特異的な反応か否かを調べる目

的で、系統の異なる SD ラットでも発現するかについて検討した。BN ラットを用いた検討と同じ投与量で D-Pen, PHT および CBZ を SD ラットに 28 日間投与した後の脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板について組織学的検査を実施した。D-Pen を 28 日間投与した SD ラットにおいては、100 mg/kg の投与量の動物では胚中心過形成はみられなかったが、500 mg/kg の投与量の動物で胚中心過形成が脾臓および腸間膜リンパ節でみられた（表 8）。一方、PHT を投与した動物の腸間膜リンパ節および脾臓ならびに、CBZ を投与した動物の腸間膜リンパ節には胚中心過形成はみられなかったが、CBZ を投与したいずれの投与量の動物でも脾臓において胚中心過形成がみられた。これらの結果から、薬剤による胚中心過形成は SD ラットでも発現することが示され、系統や遺伝的背景に依らない可能性が示唆された。

第六節 D-Pen, PHT および CBZ 投与により誘導される BN ラットおよび SD ラットの脾臓における胚中心には濾胞性ヘルパーT 細胞と局在を同じくする T 細胞が存在する

胚中心は T 細胞依存性外来抗原に対して応答する B 細胞の増殖、分化および成熟の場として二次リンパ組織に形成される領域であるが、近年、同領域には抗原特異的 B 細胞と結合したヘルパーT 細胞が分化した濾胞性ヘルパーT 細胞が存在し、B 細胞の分化および成熟に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている（Crotty, 2011）。そこで、D-Pen, PHT および CBZ を高用量で投与し、胚中心過形成がみられた BN ラットおよび SD ラットの脾臓の免疫組織化学染色を実施し、これらの胚中心に T 細胞が存在するかを確認した。図 7 に示すように媒体を投与した BN ラットにおいても胚中心がわずかに認められたが、濾胞領域に認められる T 細胞はごく少数であった。一方、D-Pen, PHT

表8 SDラットに_D-Penを投与した際の二次リンパ組織/器官への影響

器官/組織 所見	投与量 (mg/kg/day)	Vehicle	_D -Pen		PHT		CBZ	
		0	100	500	300	450	300	500
脾臓	スコア	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
胚中心過形成	0	5	5	1	5	5	2	0
	1	0	0	2	0	0	2	2
	2	0	0	2	0	0	1	3
	3	0	0	0	0	0	0	0
腸間膜リンパ節	スコア	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
胚中心過形成	0	5	5	4	5	5	5	5
	1	0	0	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
パイエル板(小腸)		(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)
異常なし		5	5	5	5	5	5	5

SDラット(n = 5/群)に媒体または_D-Penを100、500 mg/kgの各用量で、PHTを300、450 mg/kgの各用量、CBZを300、500 mg/kgの各用量で28日間にわたり投与した後、組織学的検査を実施し、脾臓、腸間膜リンパ節およびパイエル板への影響を調べた。カッコ内の数は検査した動物数を示し、胚中心過形成のスコアを0～3に分類しその動物数を示した。また、所見がみられなかった場合は「異常なし」としてその動物数を示した。なお、スコア付けは材料と方法に記載した方法に従って実施した。

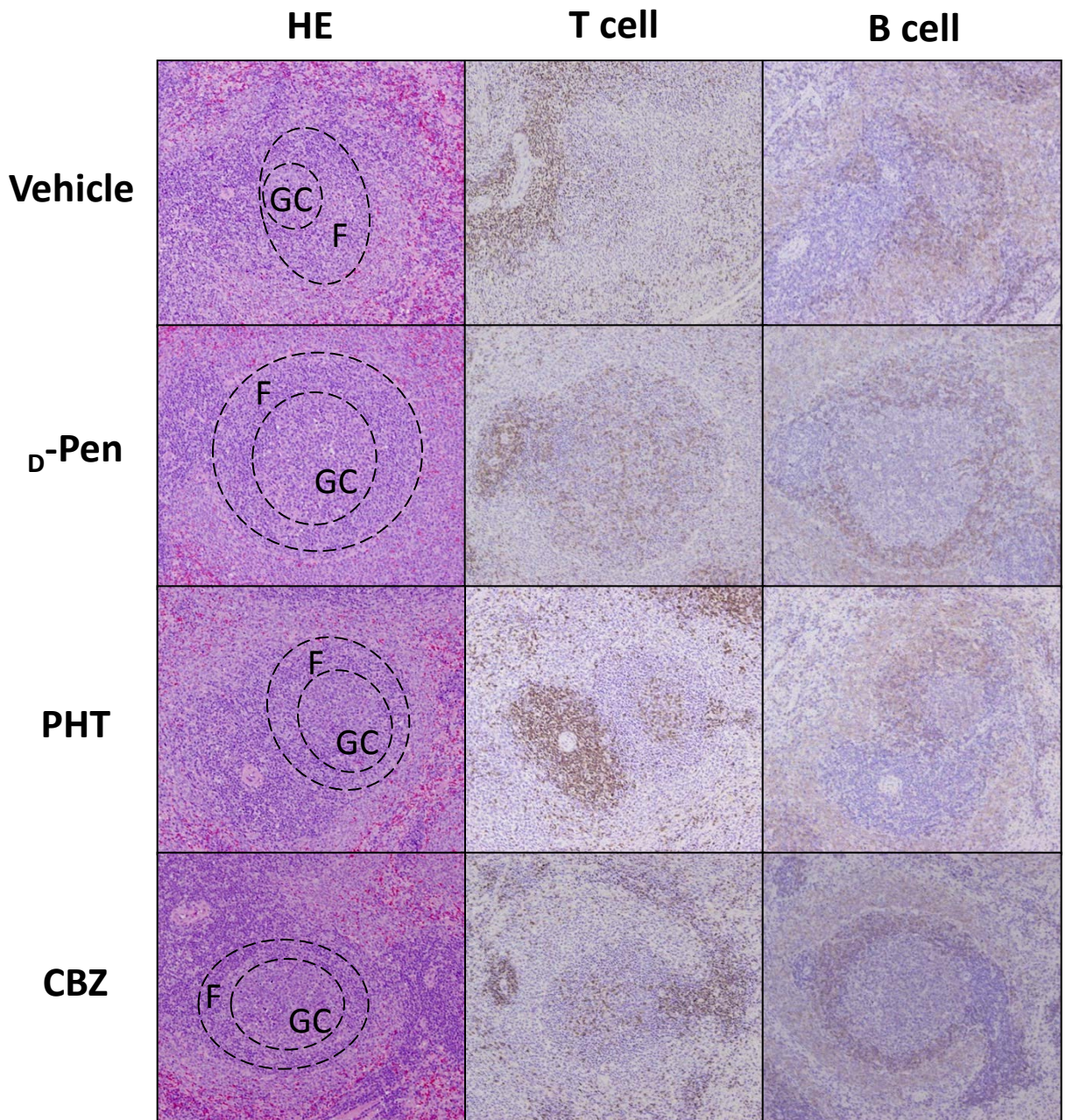


図7 BNラットに媒体、 D -Pen、PHTまたはCBZを投与した際の脾臓の胚中心におけるT細胞およびB細胞の局在

写真はBNラット($n = 5$ /群)に媒体、または D -Penを500 mg/kgの用量、PHTを450 mg/kgの用量、CBZを500 mg/kgの用量で28日間にわたり投与した後の脾臓においてみられた胚中心と免疫組織化学染色により確認されたT細胞およびB細胞の局在を示す。写真内Fは濾胞領域を示し、GCは胚中心を示す。いずれの写真も5例の動物のうちの代表例を示す。

および CBZ を投与し、胚中心過形成がみられた BN ラットでは濾胞領域に T 細胞の集積がみられ、その細胞数は明らかに媒体を投与した BN ラットの細胞数を上回るものであった。また、図 8 に示すように D-Pen および CBZ を投与した SD ラットでも胚中心の濾胞領域に T 細胞の存在が認められた。一方、媒体および PHT を投与した SD ラットの濾胞領域には T 細胞の存在は認められなかった。これらの結果から薬剤投与によって発現する胚中心にも T 細胞が存在することが示され、薬剤に対する濾胞性ヘルパー T 細胞が分化誘導されている可能性が示唆された。

第七節 D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは末梢におけるリンパ球サブセットの割合が異なる

D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットではいずれも二次リンパ組織/器官において胚中心過形成がみられたが、皮膚症状がみられたのは D-Pen を投与した BN ラットのみであった。そこで、D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットの末梢における T 細胞および B 細胞に違いがないかを調べる目的で、D-Pen, PHT および CBZ をそれぞれ、500, 450 および 500 mg/kg の投与量で 7 日間または 28 日間投与し、リンパ球サブセットの変化を継時的に調べた。末梢血については投与後 1, 3, 7, 28 日の時点の、脾臓については投与後 7, 28 日の時点のリンパ球サブセットについてフローサイトメーターを用いて解析を実施した。また、投与後 7, 28 日の脾重量測定を実施した。

図 9 に示すように末梢血のリンパ球サブセット解析では、T 細胞についてはいずれの解析日でも D-Pen, PHT および CBZ を投与した各動物において媒体投与の動物に比べ統計学的に有意な変化はみられなかった。一方、B 細胞については投与後 28 日の解析で D-Pen を投与した動物において統計学的に有意な低値、

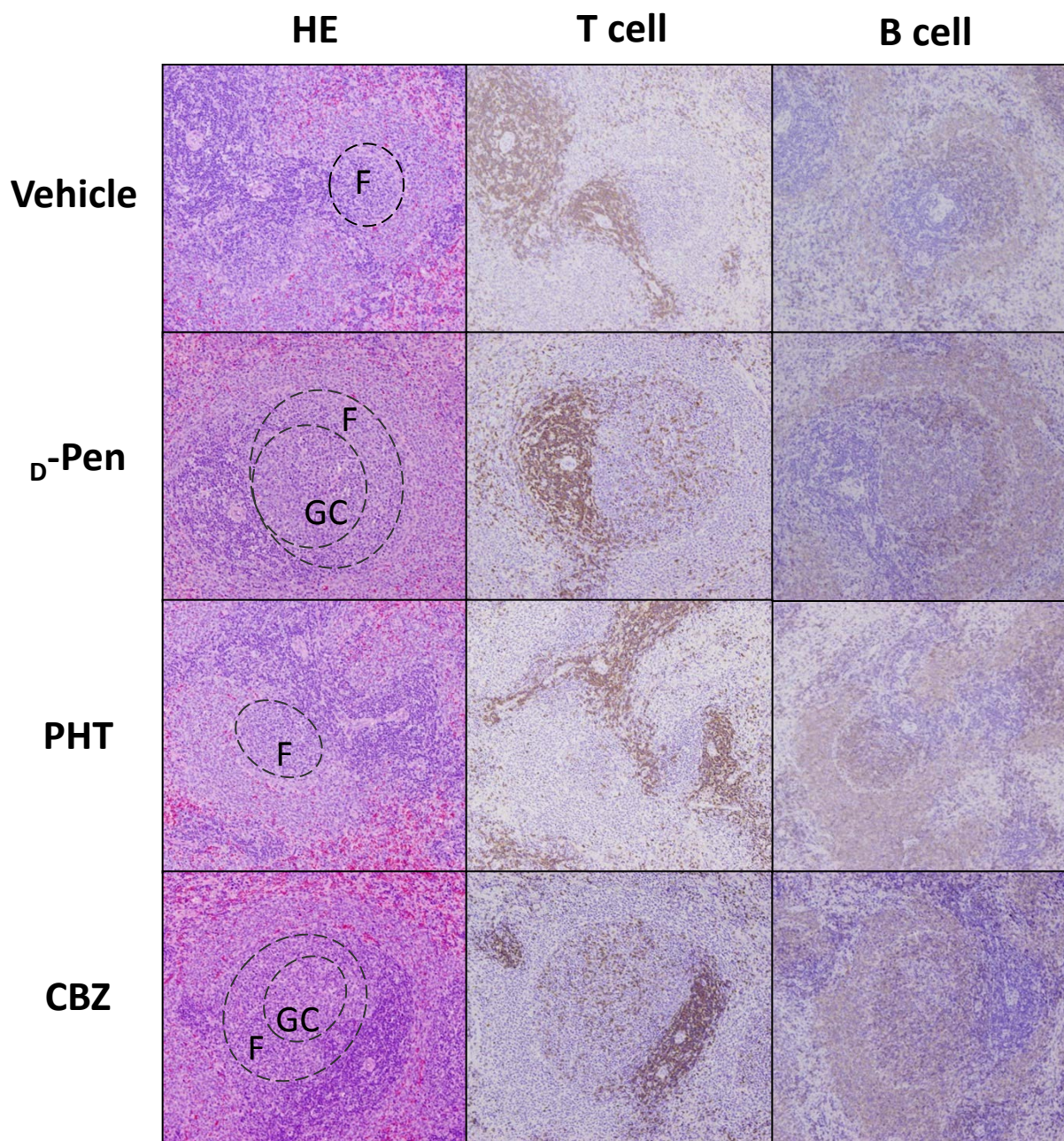


図8 SDラットに媒体、 D -Pen、PHTまたはCBZを投与した際の胚中心におけるT細胞およびB細胞の局在

写真はBNラット($n = 5$ /群)に媒体、または D -Penを500 mg/kgの用量、PHTを450 mg/kgの用量、CBZを500 mg/kgの用量で28日間にわたり投与した後の脾臓における胚中心と免疫組織化学染色により確認されたT細胞およびB細胞の局在を示す。写真内Fは濾胞領域を示し、GCは胚中心を示す。いずれの写真も5例の動物のうちの代表例を示す。

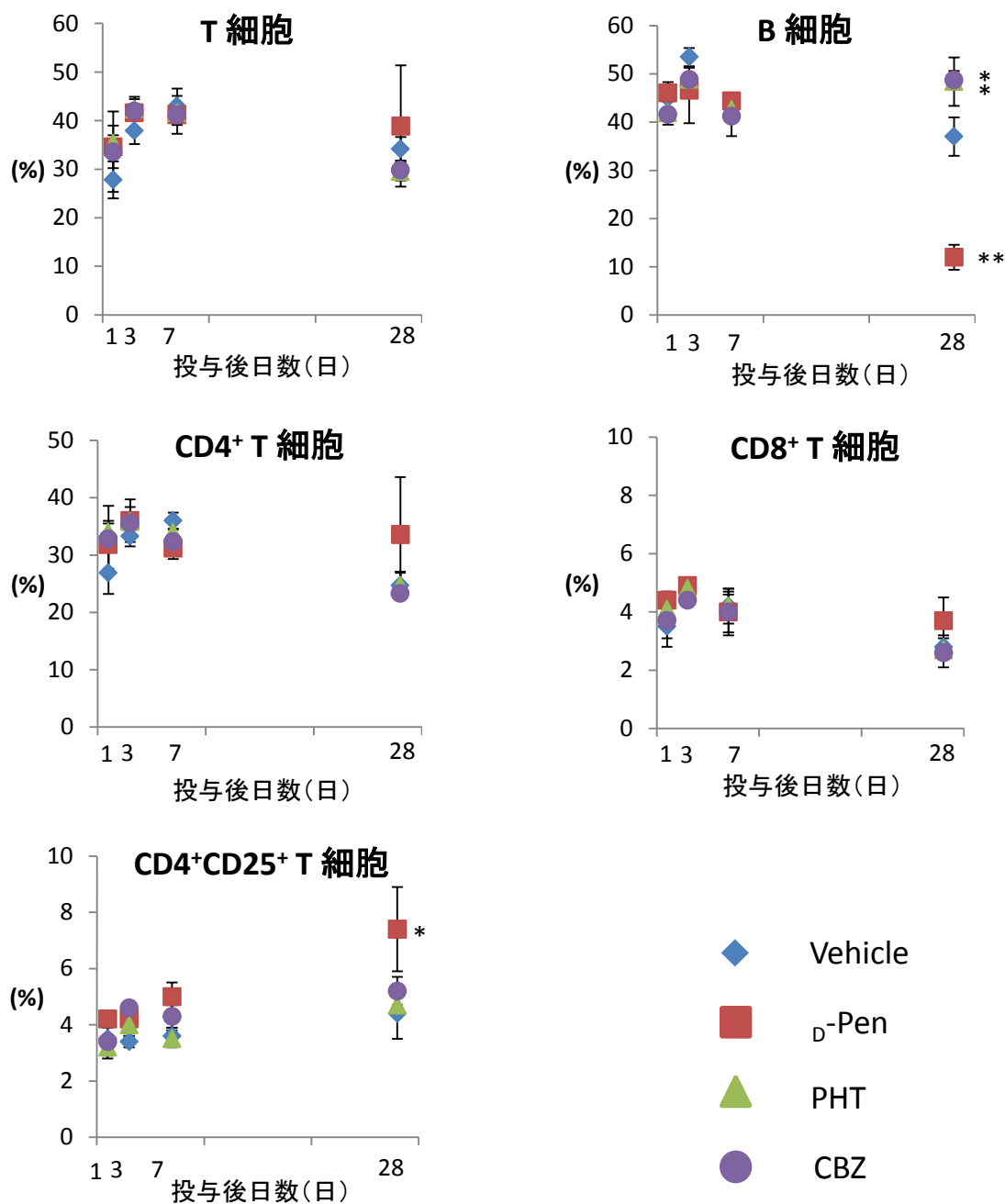


図9 BNラットに媒体、D-Pen、PHTまたはCBZを投与した際の末梢血における各リンパ球サブセットへの影響

BNラット(n = 3/群)に媒体またはD-Pen、PHT、CBZを28日間にわたり投与した際の、投与後1、3、7および28日の末梢血中におけるT細胞、B細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞およびCD4⁺CD25⁺T細胞の割合(%)をフローサイトメーターを用いて調べた。データは各細胞の割合(%)の平均値±標準偏差を示す。

*、**有意差あり、それぞれ $p < 0.05$ 、 0.01

PHT および CBZ を投与した動物において統計学的に有意な高値がみられた。CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞についてはいずれの解析日でも D-Pen, PHT および CBZ を投与した各動物において統計学的に有意な変化はみられなかったが、投与後 28 日の解析では D-Pen を投与した動物において統計学的有意差はないものの CD4⁺T 細胞の高値変化がみられた。また、CD4⁺CD25⁺T 細胞については D-Pen を投与した動物において投与後 7 日の解析で統計学有意差はないものの高値変化がみられ、投与後 28 日の解析では統計学的に有意な高値がみられた。このように D-Pen, PHT および CBZ を投与した動物の末梢血では、B 細胞、CD4⁺T 細胞および CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合が異なることが示された。

一方、図 10 に示すように脾臓のリンパ球サブセット解析では、T 細胞については投与後 7 日の解析で D-Pen, PHT および CBZ を投与したいずれの動物においても統計学的に有意な高値がみられ、投与後 28 日の解析では D-Pen を投与した動物でのみ統計学的に有意な高値がみられた。一方、B 細胞については投与後 7 日の解析で D-Pen, PHT および CBZ を投与したいずれの動物においても統計学的に有意な低値がみられ、投与後 28 日の解析では D-Pen を投与した動物でのみ統計学的に有意な低値がみられた。CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞については投与後 7 日の解析では D-Pen および CBZ を投与した動物で CD4⁺T 細胞の統計学的に有意な高値がみられ、PHT を投与した動物で CD8⁺T 細胞の統計学的に有意な高値がみられたが、投与後 28 日の解析では D-Pen を投与した動物でのみ CD4⁺T 細胞の有意な統計学的に高値がみられた。また、CD4⁺CD25⁺T 細胞については投与後 7 日の解析で D-Pen, PHT および CBZ を投与したいずれの動物においても統計学的に有意な高値がみられたが、投与後 28 日の解析では D-Pen を投与した動物でのみ統計学的に有意な高値がみられた。なお、脾重量については投与後 7 日の測定では D-Pen, PHT および CBZ を投与したいずれの動物にお

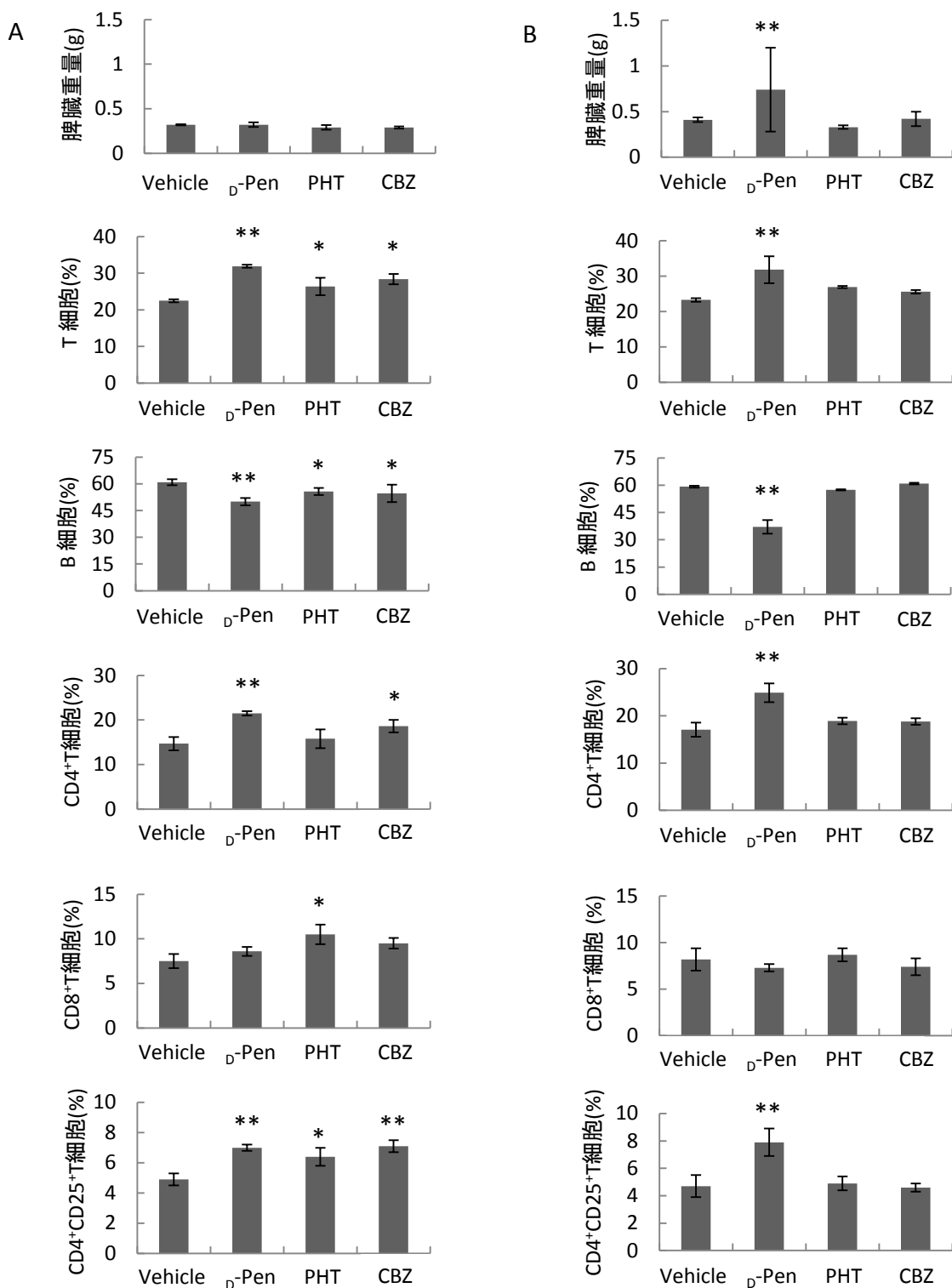


図10 BNラットに媒体、D-Pen、PHTまたはCBZを投与した際の脾臓における各リンパ球サブセットへの影響

BNラット (n = 3/群) に媒体またはD-Pen、PHT、CBZを7(A)または28(B) 日間にわたり投与した際の、脾臓におけるT細胞、B細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺CD25⁺T細胞の割合(%)をフローサイトメーターを用いて調べた。データは各細胞の割合(%)の平均値±標準偏差を示す。

*、**有意差あり、それぞれ $p < 0.05$ 、 0.01

いても統計学的に有意な変化みられなかったが、投与後 28 日の測定で D-Pen を投与した動物において統計学的に有意な高値がみられた。このように D-Pen, PHT および CBZ を投与した動物の脾臓のリンパ球サブセット解析では、投与後 7 日にみられた変化は概ね共通していたが、投与後 28 日の変化は D-Pen を投与した動物でのみみられ、PHT および CBZ を投与した動物では変化はみられなかった。以上の結果から、D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは末梢におけるリンパ球サブセットの割合が異なることが示され、これらの動物での末梢における T 細胞および B 細胞の反応が異なる可能性が示唆された。

第八節 D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは血中サイトカイン プロファイルが異なる

D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットにおいては末梢での免疫応答に違いがある可能性が示唆されたことから、これらの動物の血中サイトカインの違いについて調べる目的で、D-Pen, PHT および CBZ をそれぞれ 500, 450 および 500 mg/kg の投与量で 7 日間または 28 日間投与したときの血漿についてサイトカインアレイを用いた解析を実施し、媒体を投与した動物と比較した。

表 9 に媒体投与動物と比較していずれかの動物で 2 倍以上の発現上昇がみられたサイトカインを示すが、投与後 7 日の血漿を用いた解析ではいずれの動物においてもいくつかのサイトカインに変化がみられた。D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは共通して細胞遊走に関わるケモカインの発現上昇が、その種類や程度は異なるもののみられた。また、共通する変化として TGF- β の発現上昇がみられた。その他に、D-Pen や PHT を投与した BN ラットでは IFN γ や IL-2 といった Th1 サイトカインの発現上昇がみられ、D-Pen を投与した BN ラットでのみ IL-4 や IL-10 といった Th2 サイトカインの発現上昇がみられた。

表9 BNラットに_D-Pen、PHTおよびCBZを投与した際の血漿中サイトカインへの影響

	Day7			Day28		
	_D -Pen	PHT	CBZ	_D -Pen	PHT	CBZ
Chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3)	2.6	2.2	2.2	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20)	10.6	4.2	2.1	< 2.0	< 2.0	2.1
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1)	2.8	2.5	2.6	< 2.0	< 2.0	2.3
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)	3.1	2.2	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3)	2.4	2.1	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)	3.2	2.2	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Fas ligand (FasL or CD95L)	2.8	2.5	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	2.1	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interferon gamma (IFN γ)	2.3	6.3	< 2.0	< 2.0	< 2.0	2.1
Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10)	2.7	2.1	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin-1 alpha (IL-1 α)	3.1	2.5	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin 2 (IL-2)	2.8	2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin-3 (IL-3)	2.2	2.4	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin-4 (IL-4)	2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin-5 (IL-5)	2.6	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin-10 (IL-10)	2.1	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin-12/Interleukin-23 subunit beta (IL-12/IL-23 p40)	2.9	2.4	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Interleukin-13 (IL-13)	3.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	2.9	2.4	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1)	3.1	2.4	2.1	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Tumor necrosis factor alpha (TNF α)	2.2	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0

BNラット (n = 3/群) に媒体または_D-Pen、PHT、CBZを7または28日間にわたり投与した際の、血中サイトカインについて血漿を用いたマイクロアレイ解析にて薬剤投与動物と媒体投与動物で比較した。データは媒体投与動物に対する比率を示し、いずれかの動物で2倍以上の変化がみられたサイトカインについて示した。

一方、投与後 28 日の血漿を用いた解析では D-Pen および PHT を投与した動物では変化はみられず、CBZ を投与した動物でのみ 2 倍以上の発現上昇がみられたサイトカインが確認された。なお、いずれの解析においても 2 倍以上の発現低下がみられたサイトカインはいずれの動物にも確認されなかった。このように D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットでは血中サイトカインの発現プロファイルが異なることが示され、一方で、いくつかのケモカインや TGF- β は投与後 7 日の時点では共通して発現上昇していることが示された。

第九節 D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットの脾臓では一過性に

Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合が増加するが、D-Pen を投与した BN

ラットの脾臓ではその後 Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合が増加する

D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットの投与後 7 日の脾臓のリンパ球サブセット解析ならびに、D-Pen を投与した BN ラットの投与後 28 日の末梢血および脾臓のリンパ球サブセット解析において CD4⁺CD25⁺T 細胞の統計学的に有意な高値がみられたが、血漿中 TGF- β の上昇は投与後 7 日の解析でのみ D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットで確認された。そこで、この細胞分画が制御性 T 細胞であるかを調べる目的で、この細胞分画について Foxp3 の発現量を調べた。

図 11 に示すように投与後 7 日の解析では、D-Pen, PHT および CBZ を投与した動物の CD4⁺CD25⁺T 細胞は媒体を投与した動物の CD4⁺CD25⁺T 細胞と同様に Foxp3 分子を発現しており、Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合は D-Pen および CBZ を投与した動物において統計学的に有意な高値を示し、PHT を投与した動物では統計学的意差はないものの高値変化を示した。一方、投与後 28 日の解析では、PHT および CBZ を投与した動物の CD4⁺CD25⁺T 細胞は媒体を投与

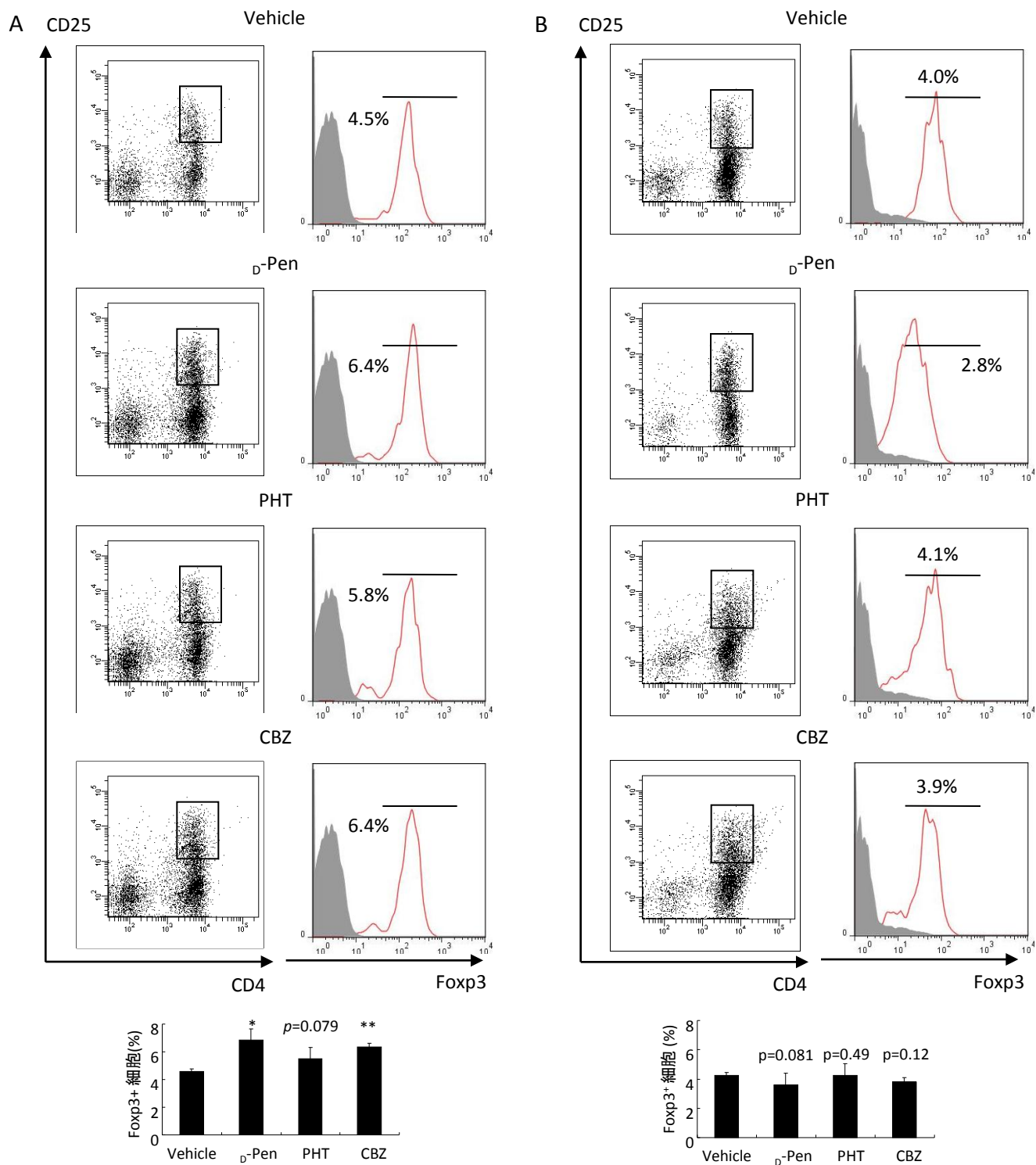


図11 BNラットに媒体、 D-Pen 、PHTまたはCBZを投与した際の脾臓の $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T細胞分画におけるFoxp3分子の発現量への影響

BNラット($n = 3/\text{群}$)に媒体または D-Pen 、PHT、CBZを7(A)または28(B)日間にわたり投与した際の $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T細胞分画におけるFoxp3分子の発現量をフローサイトメーターを用いて調べた。上段の各パネルは各投与群の代表例の $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T細胞分画のゲートと同細胞のFoxp3 $^+$ の発現を示し(灰色のラインは非染色コントロール)、パネル内に $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ T細胞の割合(%)を示す。下段のグラフは各投与群における $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ T細胞の割合(%)の平均値 \pm 標準偏差を示す。
*、**有意差あり、それぞれ $p < 0.05$ 、 0.01

した動物の CD4⁺CD25⁺T 細胞と同様に Foxp3 分子を発現していたが、D-Pen を投与した動物の CD4⁺CD25⁺T 細胞は Foxp3 分子の発現を低下させており、Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合も D-Pen を投与した動物では統計学的な有意差はないものの低値変化を示した。このように D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットの投与後 7 日の脾臓における CD4⁺CD25⁺T 細胞は Foxp3 分子を発現しており、これらの細胞は制御性 T 細胞である可能性が示唆された。一方で、D-Pen を投与した BN ラットの投与後 28 日の脾臓における CD4⁺CD25⁺T 細胞の Foxp3 の発現は低下していたことから、D-Pen を投与した BN ラットの投与後 28 日の脾臓で統計学的に有意な高値がみられた CD4⁺CD25⁺T 細胞の少なくとも一部は制御性 T 細胞でない可能性が考えられた。また、これらの結果から D-Pen を投与した BN ラットの脾臓では Foxp3 を発現していない CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合が増加していることが示された。

第四章

考察

これまでも BN ラットは化学物質誘発性の自己免疫病や食物アレルギーの研究に多く用いられてきたが (Pieters *et al.*, 2002; Knippels and Penninks, 2005), それらの研究では病態の発現やアレルギー特異的な IgE の産生のみが評価されてきた。本研究では二次リンパ組織/器官の組織学的検査を評価に取り入れ、薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤は BN ラットで胚中心過形成を誘導することを見出し、一部の薬剤については SD ラットでも胚中心過形成が誘導されることを明らかにした。また、これらの動物ではいずれも胚中心に濾胞性ヘルパー T 細胞と局在を同じくする T 細胞が存在することを示した。BN ラットを用いて比較した結果、皮膚症状の発現が認められた D-Pen を投与した BN ラットでは他の動物と同様に脾臓において一過性の Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の増加がみられたが、一方で同動物では特徴的な血液中のサイトカインプロファイルが認められ、投与の継続により脾臓において Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞が増加することを明らかにした。さらに、薬剤過敏症の発現リスクが低い薬剤である LDC を用いた検討や、すでに報告されている知見から、胚中心過形成をバイオマーカーとすることにより BN ラットを用いた薬剤過敏症予測モデルが構築できる可能性を示した。

本研究では薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤の投与によって胚中心過形成という組織学的所見がみられたが、これは単に免疫系を賦活化する化学物質に暴露された際によくみられる濾胞過形成とは異なるものである。胚中心過形成は塩化水銀を飲水投与により与えた BN ラットの脾臓でもみられるが、その発現は抗 CD80 抗体や抗 CD86 抗体を投与することによって抑えられることが示されている (MacPhee *et al.*, 2001)。この結果は外来異物により誘導される胚中心過形成は CD80 分子や CD86 分子を介した共刺激シグナルを必要とすることを

示唆するものである。T 細胞の感作には抗原に加えて共刺激シグナルが必要とされており (Matzinger, 1994), 抗原提示細胞は単に免疫賦活作用のある化学物質ではなく, 感作物質に反応した場合にのみ CD80 分子や CD86 分子の発現を上昇させることが示されている (Aiba *et al.*, 1997; Hulette *et al.*, 2005; Azam *et al.*, 2006). 実際, マウスを用いた実験では D-Pen を投与することによって脾臓中の CD80 分子および CD86 分子を高発現するマクロファージの割合が増加することが報告されている (Hulette *et al.*, 2005). これらの知見は D-Pen を含め胚中心過形成の発現がみられた薬剤は共通して CD80 分子や CD86 分子を介した共刺激シグナルを誘導することを示唆するものであり, これらの薬剤が感作物質と同様の免疫反応を惹起するポテンシャルを有する可能性が考えられた。

通常, 胚中心は T 細胞依存性抗原に対して形成され, T 細胞非依存性の抗原に対しては形成されないことが示されている (Claassen *et al.*, 1986; Goodlad and Macartney, 1995; Mond *et al.*, 1995; Garcia de Vinuesa *et al.*, 1999). 同様に, ハプテンである 4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸 (NP)-フィコールに対しては胚中心形成が起こらず, NP-オボアルブミンに対してのみ胚中心形成が起こることが示されている (Garside *et al.*, 1998). これらの結果は胚中心が T 細胞の感作が成立することで形成され, ハプテンに対しては T 細胞の感作は成立せず, ハプテン-タンパク複合体に対してのみ成立することを示すものであると考えられる。クリーンな環境下での若齢マウスのリンパ組織には胚中心が認められないことが示されている (Tsiagbe *et al.*, 1992). また, 細菌由来のリポ多糖類抗原やデキストラン B512 に対しては胚中心が形成されることが示されているが (Wang *et al.*, 1994; Sverremark and Fernandez, 1998), それらは T 細胞非依存性抗原であり, 今回の検討でみられた T 細胞の存在を認める胚中心

とは異なっている。これらの知見から、本研究で薬剤投与によってみられた胚中心形成は自然発生的に発現する胚中心形成が誘導されたものではなく、ハプテン化した薬剤とタンパクの複合体または T 細胞依存性の自己抗原に対して誘導されたものである可能性が考えられた。

本研究では D-Pen や AMX, SMX を投与した動物では腸間膜リンパ節で胚中心過形成がみられたが、PHT や CBZ を投与した動物では腸間膜リンパ節に胚中心過形成がみられなかった。これは D-Pen や AMX, SMX を投与した動物の腸間膜では代謝されていない薬剤がタンパクと複合体を形成し、PHT や CBZ では形成されなかった結果と仮定すると説明が可能である。D-Pen や AMX, SMX は T 細胞の感作に薬剤代謝を必要としないことが報告されており (Elsheikh *et al.*, 2010; Rozieres *et al.*, 2010), PHT や CBZ を投与した動物では代謝物が多く暴露される脾臓で胚中心過形成がみられたことを合わせると、各薬剤を投与した動物で薬剤またはその代謝物とタンパクとの複合体が形成され、T 細胞の感作が成立したことによって胚中心形成が誘導されたと考えることができる。薬剤過敏症の患者においては原因薬剤がハプテンとして想定されているが、今回の検討で胚中心過形成がみられた動物においても同様にハプテン化が起こっているかについては明らかになっていない。しかしながら、ネビラピンは D-Pen と同様に反復投与によって BN ラットで薬剤過敏症様症状を発症することが報告されており (Shenton *et al.*, 2003), ネビラピン投与により同症状を発症した BN ラットの脾細胞をナイーブな BN ラットに移植した実験ではネビラピンの再投与によって、24 時間以内に耳介の紅潮が観察されることが示されている (Shenton *et al.*, 2005)。この結果は薬剤がハプテンとなってメモリー T 細胞が分化誘導され得ることを示す結果であると考えられる。また、ヒトで再生不良性

貧血や肝障害といった免疫介在性の副作用を示すフェルバメイトの反応性代謝物の中間体である 3-カルボニル-2-フェニルプロピオンアルデヒドをマウスの足蹠に皮下投与した際に膝窩リンパ節で胚中心が形成されることが確認されており (Popovic *et al.*, 2004), タンパクとの共有結合性が高い代謝物類似体の投与により胚中心が形成されることが示されている. これらの知見は実験動物においても薬剤がハプテンとなり得ること, またハプテン投与によって胚中心が形成されることを示すものであり, 本研究でみられた胚中心形成が自己抗原に対するものではなく, 薬剤のハプテン化を介して発現した可能性を支持するものであると考えられた.

薬剤過敏症と HLA の特定のタイプとが深い関連があることが報告されており (Chung *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004; Hung *et al.*, 2005; Hung *et al.*, 2006; Mallal *et al.*, 2008), それらは原因薬物特異的であることが示されている. また, 薬剤過敏症を発症した患者では T 細胞受容体の特定の β 鎖をもつ T 細胞が特異的に増殖することが示されている (Mauri-Hellweg *et al.*, 1995). これらの知見は薬剤が抗原特異的な T 細胞を分化誘導し, 増殖誘導し得るかが, 薬剤過敏症の発症に重要であることを示すものであると考えられる. 一方, 本研究では薬剤過敏症の発現リスクが高い薬剤を投与したいずれの BN ラットの二次リンパ組織/器官においても胚中心過形成が認められたが, 皮膚症状がみられたのは D-Pen を投与した動物のみであったことから, 薬剤過敏症の発症にはハプテン以外の性質が薬剤に必須であると考えられた. Matzinger らによって提唱されている Danger 仮説では免疫系は自己/非自己による認識ではなく生体にとっての有害性に依存して反応するとされている (Matzinger, 1994). すなわち, 有害性を伴わない条件下で提示される抗原に対しては免疫寛容となり, 有害性のシグ

ナル存在下でのみ完全な免疫反応が誘導されると考えられている (Anderson and Matzinger, 2000). よって、薬剤過敏症の発症の有無もこの仮説に基づき考えると、薬剤が生体にとって有害と認識されるか否かが重要であると考えられる.

近年、免疫調節を担う制御性 T 細胞の存在が示され、自己免疫疾患やアレルギー反応の抑制に寄与していることが明らかにされている (Hori *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2006; Xystrakis *et al.*, 2006; Corthay, 2009). 制御性 T 細胞についてはいくつかのサブセットの存在が示されており、細胞表面抗原や分泌するサイトカイン等の違いでそれらは定義されているが (Wan and Flavell, 2006), 分化誘導の起源で考えると胸腺由来のものと、それ以外のものとに大別することができる.

Foxp3 陽性の胸腺由来の制御性 T 細胞は、免疫寛容や自己免疫の抑制維持に寄与していると考えられている (Takahashi *et al.*, 1998). この胸腺由来の制御性 T 細胞は主として自己抗原に対する免疫寛容に寄与していると考えられ、タンパク抗原に対する経口寛容には必須ではないことが示されている. 一方、胸腺以外の特定の環境下において誘導される制御性 T 細胞が存在し (Sun *et al.*, 1999; Thorstenson and Khoruts, 2001; Curotto de Lafaille *et al.*, 2008; Dhamne *et al.*, 2013), これらは TGF- β を産生する Th3 細胞や IL-10 を産生する Tr1 細胞, Foxp3 の発現が誘導される誘導性 Foxp3⁺細胞に分類することができる (Mucida *et al.*, 2005; Roncarolo *et al.*, 2006). これらの制御性 T 細胞については経口寛容に関する研究が数多く行われており、Th3 細胞が中心的な役割を果たしていると考えられている (Faria and Weiner, 2005). また、一部の抗原については経口経路で与えられることにより Foxp3⁺細胞が増殖することが報告さ

れており (Thorstenson and Khoruts, 2001; Zhang *et al.*, 2001), 非自己抗原に対する経口寛容に誘導性 Foxp3⁺細胞が関与している可能性が示されている。

本研究では D-Pen, PHT および CBZ のいずれを投与した BN ラットの脾臓においても一過性ではあるが Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞の増加がみられており, サイトカインアレイ解析の結果, 同時期に血液中 TGF- β 1 の発現上昇がみられている。また, D-Pen を低用量で経口投与した BN ラットでは脾臓において IL-10 や TGF- β を産生する CD4⁺T 細胞が誘導され, D-Pen に対して免疫寛容が誘導されることが示されている (Masson and Uetrecht, 2004)。これらの知見は今回の検討において脾臓で増加が認められた Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞が薬剤投与によって分化誘導された制御性 T 細胞である可能性を示唆するものであると考えられる。その他にも今回の検討では PHT および CBZ を投与した BN ラットでパイエル板の大型化がみられ, SMX を投与した BN ラットでは腸間膜リンパ節において傍皮質過形成がみられた。パイエル板は経口寛容によって誘導される制御性 T 細胞に対して抗原提示が行われる部位のひとつであること (du Pre and Samsom, 2011), またリンパ節の傍皮質は制御性 T 細胞の局在部位であることを考えると (Ueha *et al.*, 2007), これらの部位でも制御性 T 細胞の誘導に関連する反応が起こっている可能性が考えられた。これらの結果は薬剤に対して免疫寛容が誘導されることを示唆するものであり, 薬剤が有害であると認識されなかった結果である可能性を示すものであると考えられる。一方で, D-Pen を投与した BN ラットでは継続投与によって皮膚症状を発症することから, 同動物では何からの有害性のシグナルが同時に誘導されている可能性が考えられた。

有害性のシグナルのひとつとして TNF- α が考えられる。損傷した心筋から TNF- α が産生されることが示されており (Azzawi and Hasleton, 1999), この損傷に関連した TNF- α による樹状細胞の活性化が急性の心筋梗塞発症後の患者においてみられる自己抗体産生の原因と考えられている (Melguizo *et al.*, 1997). 本研究では D-Pen, PHT および CBZ を投与した BN ラットのうち, D-Pen を投与した動物においてのみ血液中 TNF- α の発現上昇がみられている。また, 同動物では投与 7 日の時点で肝臓に炎症性変化が確認されており (データは示さず), 炎症性変化に伴う TNF- α の産生が D-Pen を投与した BN ラット有害性のシグナルになっている可能性が考えられる。

さらに D-Pen を投与した BN ラットでは TGF- β 1 や TNF- α 以外に, Th2 サイトカインである IL-4, IL-5, IL-13 に加えて IFN γ や IL-2 といった Th1 サイトカインの発現変化が認められている。抗原提示細胞では慢性的なグルタチオンの枯渇によって抗原プロセッシングや抗原提示が抑制されること (Short *et al.*, 1996), 軽度や中程度の枯渇が種々のサイトカイン産生に影響することが示されており (Peterson *et al.*, 1998), また化学的反応性の高い薬剤は細胞内のグルタチオンを減少させることが知られている (Tingle *et al.*, 1995; Naisbitt *et al.*, 1999). さらに, D-Pen 投与によって誘導される皮膚症状の発現がプロスタグランジン-E アナログによる Th1 サイトカインの産生阻害によって抑制されることが報告されており (Sayeh and Uetrecht, 2001), D-Pen によるグルタチオン枯渇への影響は不明ではあるが, Th1 サイトカインの産生または Th1/Th2 サイトカインバランスの変化も同ラットにとって有害性シグナルになっている可能性が考えられた。

D-Pen を投与した BN ラットでは PHT や CBZ を投与した動物と異なり，投与後 28 日における Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺細胞数は対照群よりも統計学的有意差はないものの減少していた．薬剤誘発性の自己免疫と制御性 T 細胞の関連について実験動物を用いた研究がなされており，これらの細胞が薬剤によって誘導され，同時に自己抗体産生の抑制に寄与しているという結果が報告されている (Layland *et al.*, 2004)．また，高橋らの研究では TEN の患者では症状発現時に制御性 T 細胞の機能が抑制され，症状の軽減に伴いその機能が回復することが報告されている (Takahashi *et al.*, 2009)．これらの結果は薬剤によって誘導される免疫亢進に対して免疫抑制機構が働くこと，またその免疫制御機構が機能しない場合に症状が発現する可能性を示すものであると考えられる．

D-Pen を投与した BN ラットの投与後 28 日の脾臓において CD4⁺CD25⁺T 細胞は増加していたが，これらの細胞群における Foxp3 の発現は低下していたことから，同脾臓では Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺T 細胞が増加していたことになる．Foxp3 の恒常的な発現は一部，DNA の脱メチル化によって保たれていることが示されているが (Floess *et al.*, 2007; Polansky *et al.*, 2008; Huehn *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010)，一方で Foxp3 の発現については不安定さが報告されており，特定の環境下において Foxp3⁺T 細胞が Foxp3⁻T 細胞に変換することが示されている．例えば，IL-2 シグナルの阻害によって Foxp3 の発現が低下することが示されており (Rubtsov *et al.*, 2010)，経口経路でのトキソプラズマ原虫の感染モデルでは脾臓や腸管における IL-2 の産生が抑制され，これらの部位における Foxp3⁺T 細胞の数が減少することが報告されている (Oldenhove *et al.*, 2009)．また，I 型糖尿病の自己免疫モデルでは脾臓における T 細胞の Foxp3⁺の発現低下に伴い，これらの細胞群が IFN γ や IL-17 を産生する病原性の T 細胞に形質転換することが報告されている (Zhou *et al.*, 2009)．さらに，D-Pen 投与によっ

て BN ラット皮膚症状を発症した BN ラットから採取した脾臓には PMA での刺激により IL-17 を産生する T 細胞が存在し、頸部リンパ節の IL-17 産生細胞が発症前と比較して有意に増加していることから同細胞が皮膚症状の原因である可能性が示されている (Zhu *et al.*, 2011). これらの報告から D-Pen を投与した BN ラットでは Foxp3⁺T 細胞から Foxp3⁻T 細胞への変換がおこっており、Foxp3⁻T 細胞が Th17 細胞である可能性が考えられる. 試験管内において乾癬の患者の皮膚から採取した Foxp3⁺T 細胞は健常人から採取した同細胞と比較して容易に Foxp3 の発現低下と IL-17A の産生亢進が起こることが報告されており (Bovenschen *et al.*, 2011), 今回の検討でみられた BN ラットの皮膚症状の発現にこれらの一連の機序が関与している可能性が考えられた.

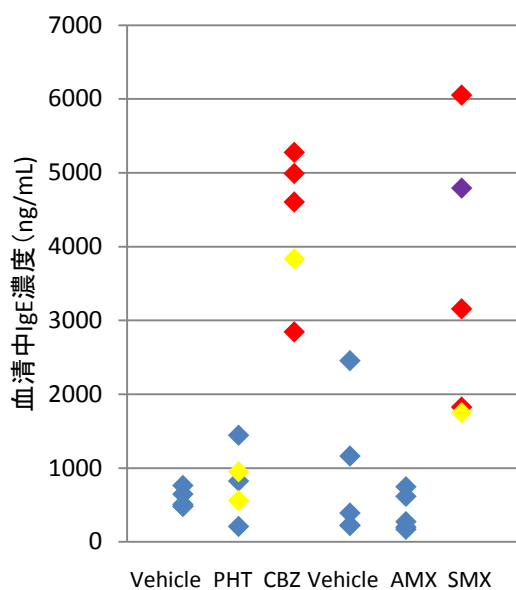
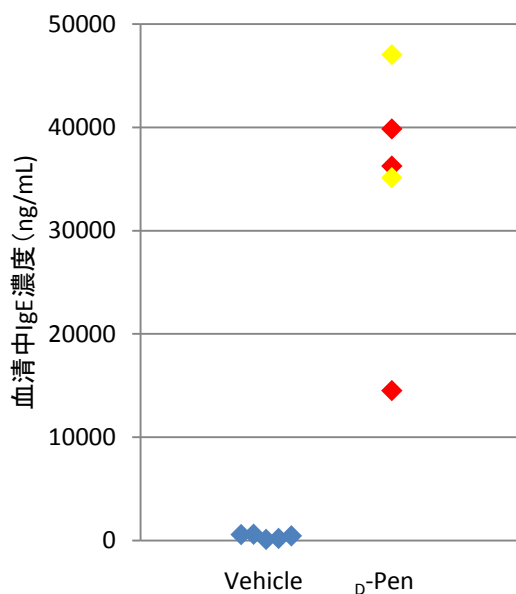
本研究では D-Pen を投与した BN ラットにおいて薬剤過敏症患者の臨床症状と類似した潮紅や腫脹といった皮膚症状が体表の様々な部位にみられたが、他の薬剤投与ではこれらの症状はみられなかった. 一方、薬剤過敏症反応の臨床徴候である炎症性細胞の増加等の血液学的変化または血清中 IgE 濃度の変化が D-Pen, CBZ, AMX および SMX を投与した BN ラットにおいてみられたが、PHT 投与ではこれらの変化はみられなかった. これらの知見は BN ラットを用いた試験系では皮膚症状の観察や血液学的検査といった評価項目は薬剤過敏症の発現リスクを予測するバイオマーカーとして感度が低いと考えられた.

IgE の産生には 2 つの経路があり、胚中心形成を伴う経路とは別に胚中心形成を伴わない経路が存在する (Aalberse and Platts-Mills, 2004). 胚中心において B 細胞の生存シグナルを伝えるタンパクのひとつである Bcl-6 を欠損した動物では胚中心が形成されないが、IgE 産生には影響がないことが示されている (Ye

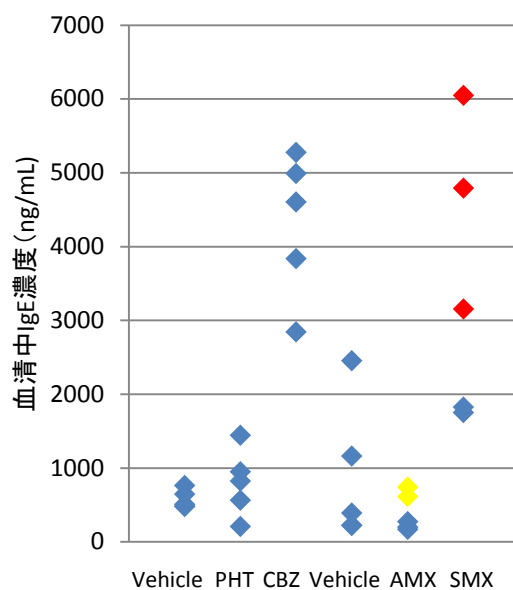
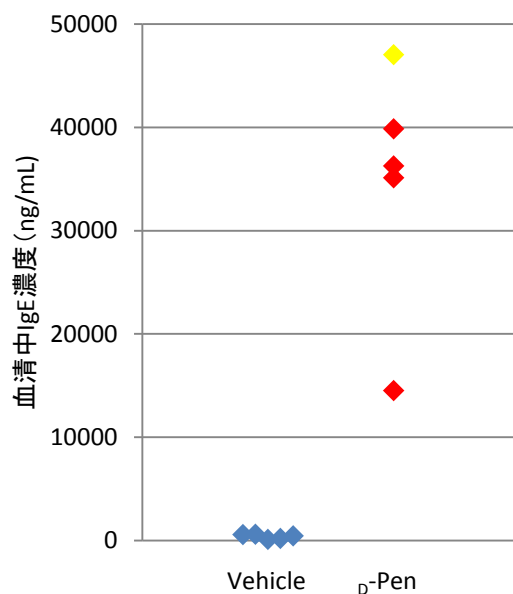
et al., 1997). 同様に, カテプシン S の非存在下でも胚中心形成が阻害され, IgG2a や IgG3 の産生は抑制されるものの IgE はコントロールと同程度産生されることが示されている (Shi *et al.*, 1999). 動物モデルにおいては弱い抗原刺激によって IgE を産生する形質細胞が直接 μ 鎖から ϵ 鎖へのクラススイッチを経て分化誘導されることが示されており (Vercelli, 2002), このメカニズムによってこれらの IgE 産生は誘導されていると考えられる. 本研究では IgE の高値が D-Pen, CBZ, SMX を投与した動物でみられたが, PHT や AMX を投与した動物では同様の変化はみられなかった. 各薬剤を高用量で投与した動物の血清中 IgE 濃度と脾臓および腸間膜リンパ節の胚中心過形成の程度について関係を示す (図 12). 図 12 に示すように高濃度の IgE 産生が認められた動物の胚中心過形成のスコアは 1 以上であることが示された. 一方, PHT を投与した 5 例を比較すると脾臓における胚中心過形成の有無と IgE 濃度に明確な相関は認められず, また D-Pen, CBZ, SMX を投与した 5 例を比較しても脾臓および腸間膜リンパ節の胚中心過形成の程度と IgE 濃度に明確な相関は認められなかった. これらの結果から, 今回の検討でみられた IgE 産生はすべてが胚中心形成を伴うものでなく, 一部は非依存性の経路によると考えられた. 薬剤過敏症の患者でも認められる IgE 産生は薬剤過敏症の発現リスクを予測するバイオマーカーとして有用であると考えられたものの, 薬剤過敏症の原因となる T 細胞感作を予測する BN ラットを用いた薬剤過敏症予測モデルにおいては不適であると考えられた.

本研究では PHT を投与した SD ラットにおいては胚中心過形成の発現や濾胞領域に T 細胞の存在は確認されなかった. 濾胞性ヘルパー T 細胞は外来抗原特異的 B 細胞に結合し分化誘導され, B 細胞の分化および成熟だけでなく, 胚中心

A



B



◆ スコア0 ◆ スコア1 ◆ スコア2 ◆ スコア3

図12 各薬剤の高用量投与動物の血清中IgE濃度と脾臓および腸間膜リンパ節の胚中心過形成の程度の関係

BNラット(n = 5/群)に媒体またはD-Pen、PHT、CBZ、AMX、SMXの各薬剤を高用量で28日間にわたり投与した際の、個体別の血清中IgE濃度と脾臓(A)および腸間膜リンパ節(B)でみられた胚中心過形成のスコアの関係を示す。各個体の脾臓および腸間膜リンパ節の胚中心過形成のスコアを上記のとおり色別けして示し、同動物の血清中IgE濃度の値をプロットした。

の維持にも重要な役割を果たしていることが示されている (Crotty, 2011; Shulman *et al.*, 2013). PHT を投与した BN ラットでは濾胞性ヘルパーT 細胞と局在を同じくする T 細胞の存在が確認されていることから, SD ラットにおいては同様の T 細胞が分化誘導されず, そのため胚中心過形成がみられなかった可能性が考えられる. BN ラットは SD ラットと異なる MHC をもち, MHC 依存的な CD8⁺T 細胞の分化異常や実験的自己免疫病態の感受性への MHC の関与が示されていること (Smilek *et al.*, 1980; Dubey *et al.*, 1991; Damoiseaux *et al.*, 1999), また T 細胞受容体の β 鎖のレパートリーについても違いが認められていることを合わせると (Fillion *et al.*, 1997), BN ラットは SD ラットに比べ PHT と高い反応性をもつ MHC と T 細胞受容体の組み合わせをもっており, SD ラットではこれが原因で胚中心の維持に寄与するヘルパーT 細胞が分化誘導されなかった可能性が考えられる. 本研究では初めて薬剤によって濾胞性ヘルパーT 細胞と考えられる T 細胞が分化誘導されることを示したが, これらの細胞の胚中心過形成への関与の程度についてはさらなる検討が必要であると考えられる.

本研究では胚中心過形成の発現頻度と薬剤の投与量との間に相関がみられ, また 7 日間投与や低用量投与の BN ラットでは胚中心過形成がみられないことが確認された. これらの結果は T 細胞介在性の胚中心過形成が薬剤の暴露量や投与期間に依存して発現していることを示し, 薬剤過敏症が薬剤の暴露量や投与期間に依存して発現することと類似している (Utrecht, 2007; Nguyen *et al.*, 2013). 胚中心は T 細胞が T 細胞依存性抗原に感作されることによって形成されるが, アジュバントなどの免疫賦活物質だけでは形成されず, 抗原であってもアジュバントによる免疫賦活作用が伴わなければ形成されない (Tsiagbe *et al.*,

1992). 実際、ヘキサクロロベンゼンは免疫賦活化能を有し、ヒトで様々な免疫介在性の副作用をもたらすことが知られているが (Cam, 1960; Peters, 1976), 非感作物質であることから BN ラットに投与しても胚中心過形成を誘導しないことが示されている (Ezendam *et al.*, 2005). 薬剤過敏症が T 細胞の感作によって誘導されると考えると、薬剤またはその代謝物とタンパクの複合体に対する免疫反応として発現したと考えられる胚中心過形成をバイオマーカーとすることは十分に妥当であると考えられる. 毒性を予測する手段として用いるバイオマーカーは正確であり、また再現性を示すものでなければならない. 本研究では薬剤過敏症リスクの高い被験薬のみが BN ラットの二次リンパ組織/器官で胚中心過形成を誘導することを示し、リドカインを投与した BN ラットでは胚中心過形成がみられないことを示した. またこれらのうち一部の薬剤については SD ラットにおいても胚中心過形成が誘導されることを示した. しかし、正確性の検証についてはより多くの陰性対照薬剤を用いて胚中心過形成が薬剤過敏症誘発薬剤に特異的な反応かを見極めるための更なる検討が必要であると考えている. 再現性については発現頻度や程度には違いがあるものの、少なくとも d-Pen や PHT, CBZ を投与した BN ラットでは複数の実験において胚中心過形成が発現することを確認しており (データは示さず)、バイオマーカーとしての要件を満たしていると考えている.

重篤な副作用になり得る薬剤過敏症の発現を予測することは薬剤の開発および患者の安全のために重要であり、製薬会社にとって急務の課題となっている. 本研究では患者において薬剤過敏症のリスクが高い薬剤を BN ラットに反復経口投与することにより、二次リンパ組織/器官で胚中心過形成が発現することを見出し、これをバイオマーカーとすることにより BN ラットを用いて薬剤過敏

症を予測する動物モデルが構築できる可能性を示した。本成果は新薬開発の早期段階で過敏症反応を惹起する薬剤を排除することを可能にし、同時にこれらの薬剤の市場導入を防ぐことにより患者に安全性の高い医薬品を提供することに貢献するものと考えられる。またこの動物モデルを用いた検討によって、薬剤過敏症のリスクが高い薬剤は濾胞性ヘルパーT細胞を分化誘導すること、さらには制御性T細胞を分化誘導させる性質を合わせ持っている可能性を示した。本検討で得られた結果と既知の知見とを合わせて考察すると、D-Penによって誘発される薬剤過敏症の一部に制御性T細胞から形質転換した病原性のT細胞が関与している可能性が考えられる。これらの知見は薬剤によって誘発される過敏症反応の発現メカニズムの解明の一助になり得るものであり、薬剤過敏症の予防や治療法の確立に寄与するものと考えられる。今後の研究では薬剤過敏症のリスクを最も高く予測するバイオマーカーの探索を進めるとともに、薬剤過敏症が特異体質的に発現する原因の追究に取り組みたいと考えている。

文献

- Aalberse, R.C., Platts-Mills, T.A., 2004. How do we avoid developing allergy: modifications of the TH2 response from a B-cell perspective. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 983-986.
- Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z.U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., Tagami, H., 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* **120**, 390-399.
- Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H., 1997. Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* **27**, 3031-3038.
- Anderson, C.C., Matzinger, P., 2000. Danger: the view from the bottom of the cliff. *Semin Immunol* **12**, 231-238; discussion 257-344.
- Auquier-Dunant, A., Mockenhaupt, M., Naldi, L., Correia, O., Schroder, W., Roujeau, J.C., 2002. Correlations between clinical patterns and causes of erythema multiforme majus, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: results of an international prospective study. *Arch Dermatol* **138**, 1019-1024.
- Azam, P., Peiffer, J.L., Chamousset, D., Tissier, M.H., Bonnet, P.A., Vian, L., Fabre, I., Ourlin, J.C., 2006. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol* **212**, 14-23.
- Azzawi, M., Hasleton, P., 1999. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovasc Res* **43**, 850-859.
- Bala, S., Weaver, J., Hastings, K.L., 2005. Clinical relevance of preclinical testing for allergic side effects. *Toxicology* **209**, 195-200.
- Baldo, B.A., Zhao, Z., Pham, N.H., 2008. Antibiotic allergy: immunochemical and clinical considerations. *Curr Allergy Asthma Rep* **8**, 49-55.
- Bastuji-Garin, S., Rzany, B., Stern, R.S., Shear, N.H., Naldi, L., Roujeau, J.C., 1993. Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme. *Arch Dermatol* **129**, 92-96.
- Beylot, C., Doutre, M.S., Beylot-Barry, M., 1996. Acute generalized exanthematous pustulosis. *Semin Cutan Med Surg* **15**, 244-249.
- Bircher, A.J., 1999. Drug-induced urticaria and angioedema caused by non-IgE mediated pathomechanisms. *Eur J Dermatol* **9**, 657-663; quiz 663.
- Bocquet, H., Bagot, M., Roujeau, J.C., 1996. Drug-induced pseudolymphoma and drug

- hypersensitivity syndrome (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms: DRESS). *Semin Cutan Med Surg* **15**, 250-257.
- Borda, I.T., Slone, D., Jick, H., 1968. Assessment of adverse reactions within a drug surveillance program. *JAMA* **205**, 645-647.
- Bovenschen, H.J., van de Kerkhof, P.C., van Erp, P.E., Woestenenk, R., Joosten, I., Koenen, H.J., 2011. Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol* **131**, 1853-1860.
- Brockmoller, J., Cascorbi, I., Kerb, R., Sachse, C., Roots, I., 1998. Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol Lett* **102-103**, 173-183.
- Brockow, K., Romano, A., 2008. Skin tests in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions. *Curr Pharm Des* **14**, 2778-2791.
- Buchmiller, B.L., Khan, D.A., 2007. Evaluation and management of pediatric drug allergic reactions. *Curr Allergy Asthma Rep* **7**, 402-409.
- Cam, C., 1960. [A new epidemic dermatosis of children]. *Ann Dermatol Syphiligr (Paris)* **87**, 393-397.
- Carr, A., Cooper, D.A., 1995. Pathogenesis and management of HIV-associated drug hypersensitivity. *AIDS Clin Rev*, 65-97.
- Chung, W.H., Hung, S.I., Hong, H.S., Hsieh, M.S., Yang, L.C., Ho, H.C., Wu, J.Y., Chen, Y.T., 2004. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature* **428**, 486.
- Claassen, E., Kors, N., Dijkstra, C.D., Van Rooijen, N., 1986. Marginal zone of the spleen and the development and localization of specific antibody-forming cells against thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens. *Immunology* **57**, 399-403.
- Corthay, A., 2009. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* **70**, 326-336.
- Cribb, A.E., Lee, B.L., Trepanier, L.A., Spielberg, S.P., 1996. Adverse reactions to sulphonamide and sulphonamide-trimethoprim antimicrobials: clinical syndromes and pathogenesis. *Adverse Drug React Toxicol Rev* **15**, 9-50.
- Crotty, S., 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* **29**, 621-663.
- Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., Lafaille, J.J., 2008. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* **29**, 114-126.
- Damoiseaux, J.G., Cautain, B., Bernard, I., Mas, M., van Breda Vriesman, P.J., Druet, P., Fournie, G., Saoudi, A., 1999. A dominant role for the thymus and MHC genes in determining the peripheral CD4/CD8 T cell ratio in the rat. *J Immunol* **163**, 2983-2989.

- de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S., van den Anker, J.N., 1999. Glucuronidation in humans. Pharmacogenetic and developmental aspects. *Clin Pharmacokinet* **36**, 439-452.
- Descotes, J., 2006. Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**, 249-259.
- deShazo, R.D., Kemp, S.F., 1997. Allergic reactions to drugs and biologic agents. *JAMA* **278**, 1895-1906.
- Dhamne, C., Chung, Y., Alousi, A.M., Cooper, L.J., Tran, D.Q., 2013. Peripheral and thymic foxp3(+) regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. *Front Immunol* **4**, 253.
- du Pre, M.F., Samsom, J.N., 2011. Adaptive T-cell responses regulating oral tolerance to protein antigen. *Allergy* **66**, 478-490.
- Dubey, C., Bellon, B., Hirsch, F., Kuhn, J., Vial, M.C., Goldman, M., Druet, P., 1991. Increased expression of class II major histocompatibility complex molecules on B cells in rats susceptible or resistant to HgCl₂-induced autoimmunity. *Clin Exp Immunol* **86**, 118-123.
- Elsheikh, A., Lavergne, S.N., Castrejon, J.L., Farrell, J., Wang, H., Sathish, J., Pichler, W.J., Park, B.K., Naisbitt, D.J., 2010. Drug antigenicity, immunogenicity, and costimulatory signaling: evidence for formation of a functional antigen through immune cell metabolism. *J Immunol* **185**, 6448-6460.
- Ezendam, J., Kosterman, K., Spijkerboer, H., Bleumink, R., Hassing, I., van Rooijen, N., Vos, J.G., Pieters, R., 2005. Macrophages are involved in hexachlorobenzene-induced adverse immune effects. *Toxicol Appl Pharmacol* **209**, 19-27.
- Faria, A.M., Weiner, H.L., 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev* **206**, 232-259.
- Fillion, J., Baccala, R., Pannetier, C., Kuhn, J., Druet, P., Bellon, B., 1997. Evidence for heterogeneous TCR V beta repertoire expression in mercury-induced immune disorders in rats. *Int Immunol* **9**, 263-271.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A., Huehn, J., 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* **5**, e38.
- Friedmann, P.S., Lee, M.S., Friedmann, A.C., Barnetson, R.S., 2003. Mechanisms in cutaneous drug hypersensitivity reactions. *Clin Exp Allergy* **33**, 861-872.
- Garcia de Vinuesa, C., O'Leary, P., Sze, D.M., Toellner, K.M., MacLennan, I.C., 1999. T-independent type 2 antigens induce B cell proliferation in multiple splenic sites, but exponential growth is confined to extrafollicular foci. *Eur J Immunol* **29**, 1314-1323.

- Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J., Jenkins, M.K., 1998. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* **281**, 96-99.
- Gleichmann, H., 1981. Studies on the mechanism of drug sensitization: T-cell-dependent popliteal lymph node reaction to diphenylhydantoin. *Clin Immunol Immunopathol* **18**, 203-211.
- Gonzalez, F.J., 1998. The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicol Lett* **102-103**, 161-166.
- Goodlad, J.R., Macartney, J.C., 1995. Germinal-center cell proliferation in response to T-independent antigens: a stathmokinetic, morphometric and immunohistochemical study in vivo. *Eur J Immunol* **25**, 1918-1926.
- Griem, P., Wulferink, M., Sachs, B., Gonzalez, J.B., Gleichmann, E., 1998. Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise? *Immunol Today* **19**, 133-141.
- Gruchalla, R.S., Pirmohamed, M., 2006. Clinical practice. Antibiotic allergy. *N Engl J Med* **354**, 601-609.
- Guengerich, F.P., 1990. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**, 97-153.
- Guillon, J.M., Joly, P., Autran, B., Denis, M., Akoun, G., Debre, P., Mayaud, C., 1992. Minocycline-induced cell-mediated hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med* **117**, 476-481.
- Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S., 2003. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Adv Immunol* **81**, 331-371.
- Huehn, J., Polansky, J.K., Hamann, A., 2009. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* **9**, 83-89.
- Hulette, B.C., Ryan, C.A., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2005. Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells exposed to chemical allergen. *Toxicol Appl Pharmacol* **209**, 159-166.
- Hung, S.I., Chung, W.H., Jee, S.H., Chen, W.C., Chang, Y.T., Lee, W.R., Hu, S.L., Wu, M.T., Chen, G.S., Wong, T.W., Hsiao, P.F., Chen, W.H., Shih, H.Y., Fang, W.H., Wei, C.Y., Lou, Y.H., Huang, Y.L., Lin, J.J., Chen, Y.T., 2006. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. *Pharmacogenet Genomics* **16**, 297-306.
- Hung, S.I., Chung, W.H., Liou, L.B., Chu, C.C., Lin, M., Huang, H.P., Lin, Y.L., Lan, J.L., Yang, L.C., Hong, H.S., Chen, M.J., Lai, P.C., Wu, M.S., Chu, C.Y., Wang, K.H., Chen, C.H., Fann, C.S., Wu, J.Y., Chen, Y.T., 2005. HLA-B*5801 allele as a genetic marker

- for severe cutaneous adverse reactions caused by allopurinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 4134-4139.
- Hunziker, T., Kunzi, U.P., Braunschweig, S., Zehnder, D., Hoigne, R., 1997. Comprehensive hospital drug monitoring (CHDM): adverse skin reactions, a 20-year survey. *Allergy* **52**, 388-393.
- Jackson, D., Chen, A.H., Bennett, C.R., 1994. Identifying true lidocaine allergy. *J Am Dent Assoc* **125**, 1362-1366.
- Janmohamed, A., Dolphin, C.T., Phillips, I.R., Shephard, E.A., 2001. Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochem Pharmacol* **62**, 777-786.
- Johnson, J.A., Bootman, J.L., 1995. Drug-related morbidity and mortality. A cost-of-illness model. *Arch Intern Med* **155**, 1949-1956.
- Kao, J., Carver, M.P., 1990. Cutaneous metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev* **22**, 363-410.
- Kaur, S., Sarkar, R., Thami, G.P., Kanwar, A.J., 2002. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. *Pediatr Dermatol* **19**, 142-145.
- Khan, D.A., Solensky, R., 2010. Drug allergy. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S126-137.
- Kimber, I., Cumberbatch, M., 1992. Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol Appl Pharmacol* **117**, 137-146.
- Knight, C.G., Green, N.M., 1979. Interaction of dinitrophenyl groups bound to bovine serum albumin with univalent fragments of anti-dinitrophenyl antibody. *Biochem J* **177**, 225-236.
- Knippels, L.M., Penninks, A.H., 2005. Recent advances using rodent models for predicting human allergenicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 157-160.
- Korkij, W., Soltani, K., 1984. Fixed drug eruption. A brief review. *Arch Dermatol* **120**, 520-524.
- Landsteiner, K., Jacobs, J., 1935. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J Exp Med* **61**, 643-656.
- Layland, L.E., Wulferink, M., Dierkes, S., Gleichmann, E., 2004. Drug-induced autoantibody formation in mice: triggering by primed CD4+CD25- T cells, prevention by primed CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol* **34**, 36-46.
- Levine, B.B., Ovary, Z., 1961. Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D-alpha-benzylpenicilloyl) group as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. *J Exp Med* **114**, 875-904.
- Ling, E.M., Smith, T., Nguyen, X.D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V.A., Robinson, D.S., 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of

- allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* **363**, 608-615.
- Lisi, P., Stingeni, L., 1993. Fixed drug eruption: bullous form. *Clin Dermatol* **11**, 461-466.
- MacPhee, I.A., Turner, D.R., Yagita, H., Oliveira, D.B., 2001. CD80(B7.1) and CD86(B7.2) do not have distinct roles in setting the Th1/Th2 balance in autoimmunity in rats. *Scand J Immunol* **54**, 486-494.
- Mallal, S., Phillips, E., Carosi, G., Molina, J.M., Workman, C., Tomazic, J., Jagel-Guedes, E., Rugina, S., Kozyrev, O., Cid, J.F., Hay, P., Nolan, D., Hughes, S., Hughes, A., Ryan, S., Fitch, N., Thorborn, D., Benbow, A., 2008. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* **358**, 568-579.
- Martin, A.M., Nolan, D., Gaudieri, S., Almeida, C.A., Nolan, R., James, I., Carvalho, F., Phillips, E., Christiansen, F.T., Purcell, A.W., McCluskey, J., Mallal, S., 2004. Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4180-4185.
- Masson, M.J., Uetrecht, J.P., 2004. Tolerance induced by low dose D-penicillamine in the brown Norway rat model of drug-induced autoimmunity is immune-mediated. *Chem Res Toxicol* **17**, 82-94.
- Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991-1045.
- Mauri-Hellweg, D., Bettens, F., Mauri, D., Brander, C., Hunziker, T., Pichler, W.J., 1995. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine. *J Immunol* **155**, 462-472.
- McKenna, J.K., Leiferman, K.M., 2004. Dermatologic drug reactions. *Immunol Allergy Clin North Am* **24**, 399-423, vi.
- Melguizo, C., Prados, J., Velez, C., Aranega, A.E., Marchal, J.A., Aranega, A., 1997. Clinical significance of antiheart antibodies after myocardial infarction. *Jpn Heart J* **38**, 779-786.
- Merk, H.F., Hertl, M., 1996. Immunologic mechanisms of cutaneous drug reactions. *Semin Cutan Med Surg* **15**, 228-235.
- Mills, B.J., Lang, C.A., 1996. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. *Biochem Pharmacol* **52**, 401-406.
- Mond, J.J., Lees, A., Snapper, C.M., 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* **13**, 655-692.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., Curotto de Lafaille, M.A., 2005. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* **115**, 1923-1933.

- Naisbitt, D.J., Gordon, S.F., Pirmohamed, M., Park, B.K., 2000. Immunological principles of adverse drug reactions: the initiation and propagation of immune responses elicited by drug treatment. *Drug Saf* **23**, 483-507.
- Naisbitt, D.J., Hough, S.J., Gill, H.J., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Park, B.K., 1999. Cellular disposition of sulphamethoxazole and its metabolites: implications for hypersensitivity. *Br J Pharmacol* **126**, 1393-1407.
- Naisbitt, D.J., Pirmohamed, M., Park, B.K., 2003. Immunopharmacology of hypersensitivity reactions to drugs. *Curr Allergy Asthma Rep* **3**, 22-29.
- Neugut, A.I., Ghatak, A.T., Miller, R.L., 2001. Anaphylaxis in the United States: an investigation into its epidemiology. *Arch Intern Med* **161**, 15-21.
- Nguyen, A.T., Gentry, C.A., Furrh, R.Z., 2013. A comparison of adverse drug reactions between high- and standard-dose trimethoprim-sulfamethoxazole in the ambulatory setting. *Curr Drug Saf* **8**, 114-119.
- Nigen, S., Knowles, S.R., Shear, N.H., 2003. Drug eruptions: approaching the diagnosis of drug-induced skin diseases. *J Drugs Dermatol* **2**, 278-299.
- Oldenhove, G., Bouladoux, N., Wohlfert, E.A., Hall, J.A., Chou, D., Dos Santos, L., O'Brien, S., Blank, R., Lamb, E., Natarajan, S., Kastenmayer, R., Hunter, C., Grigg, M.E., Belkaid, Y., 2009. Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* **31**, 772-786.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A., 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**, 56-67.
- Park, B.K., Grabowski, P.S., Yeung, J.H., Breckenridge, A.M., 1982. Drug protein conjugates--I. A study of the covalent binding of [¹⁴C]captopril to plasma proteins in the rat. *Biochem Pharmacol* **31**, 1755-1760.
- Park, B.K., Kitteringham, N.R., 1990. Drug-protein conjugation and its immunological consequences. *Drug Metab Rev* **22**, 87-144.
- Park, B.K., Kitteringham, N.R., Powell, H., Pirmohamed, M., 2000. Advances in molecular toxicology-towards understanding idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology* **153**, 39-60.
- Park, B.K., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., 1992. Idiosyncratic drug reactions: a mechanistic evaluation of risk factors. *Br J Clin Pharmacol* **34**, 377-395.
- Park, B.K., Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., 1998. Role of drug disposition in drug hypersensitivity: a chemical, molecular, and clinical perspective. *Chem Res Toxicol* **11**, 969-988.
- Parker, C.W., 1982. Allergic reactions in man. *Pharmacol Rev* **34**, 85-104.

- Peters, H.A., 1976. Hexachlorobenzene poisoning in Turkey. *Fed Proc* **35**, 2400-2403.
- Peterson, J.D., Herzenberg, L.A., Vasquez, K., Waltenbaugh, C., 1998. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3071-3076.
- Pichler, W.J., 2002. Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2**, 301-305.
- Pichler, W.J., 2003. Delayed drug hypersensitivity reactions. *Ann Intern Med* **139**, 683-693.
- Pieters, R., Albers, R., 1999. Screening tests for autoimmune-related immunotoxicity. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 5**, 673-677.
- Pieters, R., Ezendam, J., Bleumink, R., Bol, M., Nierkens, S., 2002. Predictive testing for autoimmunity. *Toxicol Lett* **127**, 83-91.
- Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Park, B.K., 1992. Idiosyncratic reactions to antidepressants: a review of the possible mechanisms and predisposing factors. *Pharmacol Ther* **53**, 105-125.
- Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Park, B.K., 1994. The role of active metabolites in drug toxicity. *Drug Saf* **11**, 114-144.
- Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., Huehn, J., 2008. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* **38**, 1654-1663.
- Popovic, M., Nierkens, S., Pieters, R., Uetrecht, J., 2004. Investigating the role of 2-phenylpropenal in felbamate-induced idiosyncratic drug reactions. *Chem Res Toxicol* **17**, 1568-1576.
- Ratajczak, H.V., 2004. Drug-induced hypersensitivity: role in drug development. *Toxicol Rev* **23**, 265-280.
- Reilly, T.P., Lash, L.H., Doll, M.A., Hein, D.W., Woster, P.M., Svensson, C.K., 2000. A role for bioactivation and covalent binding within epidermal keratinocytes in sulfonamide-induced cutaneous drug reactions. *J Invest Dermatol* **114**, 1164-1173.
- Rieder, M.J., 1994. Mechanisms of unpredictable adverse drug reactions. *Drug Saf* **11**, 196-212.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., Levings, M.K., 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* **212**, 28-50.
- Roujeau, J.C., 1991. [Acute edema of the face. Diagnostic orientation and management]. *Rev Prat* **41**, 2371-2373.
- Roujeau, J.C., 2005. Clinical heterogeneity of drug hypersensitivity. *Toxicology* **209**, 123-129.
- Roychowdhury, S., Svensson, C.K., 2005. Mechanisms of drug-induced delayed-type

- hypersensitivity reactions in the skin. *AAPS J* **7**, E834-846.
- Rozieres, A., Vocanson, M., Rodet, K., Benetiere, J., Bienvenu, J., Berard, F., Hennino, A., Nicolas, J.F., 2010. CD8+ T cells mediate skin allergy to amoxicillin in a mouse model. *Allergy* **65**, 996-1003.
- Rubtsov, Y.P., Niec, R.E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., Rudensky, A.Y., 2010. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* **329**, 1667-1671.
- Sabroe, R.A., Seed, P.T., Francis, D.M., Barr, R.M., Black, A.K., Greaves, M.W., 1999. Chronic idiopathic urticaria: comparison of the clinical features of patients with and without anti-FcepsilonRI or anti-IgE autoantibodies. *J Am Acad Dermatol* **40**, 443-450.
- Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., Nomura, T., 2006. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**, 8-27.
- Salinas, A.E., Wong, M.G., 1999. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem* **6**, 279-309.
- Sayeh, E., Uetrecht, J.P., 2001. Factors that modify penicillamine-induced autoimmunity in Brown Norway rats: failure of the Th1/Th2 paradigm. *Toxicology* **163**, 195-211.
- Schmid, D.A., Depta, J.P., Luthi, M., Pichler, W.J., 2006. Transfection of drug-specific T-cell receptors into hybridoma cells: tools to monitor drug interaction with T-cell receptors and evaluate cross-reactivity to related compounds. *Mol Pharmacol* **70**, 356-365.
- Schnyder, B., Mauri-Hellweg, D., Zanni, M., Bettens, F., Pichler, W.J., 1997. Direct, MHC-dependent presentation of the drug sulfamethoxazole to human alphabeta T cell clones. *J Clin Invest* **100**, 136-141.
- Sheikh, A., Shehata, Y.A., Brown, S.G., Simons, F.E., 2008. Adrenaline (epinephrine) for the treatment of anaphylaxis with and without shock. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006312.
- Shenton, J.M., Popovic, M., Chen, J., Masson, M.J., Uetrecht, J.P., 2005. Evidence of an immune-mediated mechanism for an idiosyncratic nevirapine-induced reaction in the female Brown Norway rat. *Chem Res Toxicol* **18**, 1799-1813.
- Shenton, J.M., Teranishi, M., Abu-Asab, M.S., Yager, J.A., Uetrecht, J.P., 2003. Characterization of a potential animal model of an idiosyncratic drug reaction: nevirapine-induced skin rash in the rat. *Chem Res Toxicol* **16**, 1078-1089.
- Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., Chapman, H.A., 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206.
- Short, S., Merkel, B.J., Caffrey, R., McCoy, K.L., 1996. Defective antigen processing

- correlates with a low level of intracellular glutathione. *Eur J Immunol* **26**, 3015-3020.
- Shulman, Z., Gitlin, A.D., Targ, S., Jankovic, M., Pasqual, G., Nussenzweig, M.C., Victora, G.D., 2013. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* **341**, 673-677.
- Smilek, D.E., Boyd, H.C., Wilson, D.B., Zmijewski, C.M., Fitch, F.W., McKearn, T.J., 1980. Monoclonal rat anti-major histocompatibility complex antibodies display specificity for rat, mouse, and human target cells. *J Exp Med* **151**, 1139-1150.
- Sun, J., Dirden-Kramer, B., Ito, K., Ernst, P.B., Van Houten, N., 1999. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J Immunol* **162**, 5868-5875.
- Sverremark, E., Fernandez, C., 1998. Role of T cells and germinal center formation in the generation of immune responses to the thymus-independent carbohydrate dextran B512. *J Immunol* **161**, 4646-4651.
- Swanson, H.I., 2004. Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem Biol Interact* **149**, 69-79.
- Takahashi, R., Kano, Y., Yamazaki, Y., Kimishima, M., Mizukawa, Y., Shiohara, T., 2009. Defective regulatory T cells in patients with severe drug eruptions: timing of the dysfunction is associated with the pathological phenotype and outcome. *J Immunol* **182**, 8071-8079.
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., Sakaguchi, S., 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* **10**, 1969-1980.
- Thorstenson, K.M., Khoruts, A., 2001. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* **167**, 188-195.
- Thyssen, J.P., Menne, T., Elberling, J., Plaschke, P., Johansen, J.D., 2008. Hypersensitivity to local anaesthetics--update and proposal of evaluation algorithm. *Contact Dermatitis* **59**, 69-78.
- Tingle, M.D., Jewell, H., Maggs, J.L., O'Neill, P.M., Park, B.K., 1995. The bioactivation of amodiaquine by human polymorphonuclear leucocytes in vitro: chemical mechanisms and the effects of fluorine substitution. *Biochem Pharmacol* **50**, 1113-1119.
- Tsiagbe, V.K., Linton, P.J., Thorbecke, G.J., 1992. The path of memory B-cell development. *Immunol Rev* **126**, 113-141.

- Ueha, S., Yoneyama, H., Hontsu, S., Kurachi, M., Kitabatake, M., Abe, J., Yoshie, O., Shibayama, S., Sugiyama, T., Matsushima, K., 2007. CCR7 mediates the migration of Foxp3⁺ regulatory T cells to the paracortical areas of peripheral lymph nodes through high endothelial venules. *J Leukoc Biol* **82**, 1230-1238.
- Uetrecht, J., 2005. Role of drug metabolism for breaking tolerance and the localization of drug hypersensitivity. *Toxicology* **209**, 113-118.
- Uetrecht, J., 2006. Evaluation of which reactive metabolite, if any, is responsible for a specific idiosyncratic reaction. *Drug Metab Rev* **38**, 745-753.
- Uetrecht, J., 2007. Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 513-539.
- Uetrecht, J., 2008. Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. *Chem Res Toxicol* **21**, 84-92.
- Uetrecht, J.P., 1989. Idiosyncratic drug reactions: possible role of reactive metabolites generated by leukocytes. *Pharm Res* **6**, 265-273.
- Uetrecht, J.P., 1992. The role of leukocyte-generated reactive metabolites in the pathogenesis of idiosyncratic drug reactions. *Drug Metab Rev* **24**, 299-366.
- Vercelli, D., 2002. Novel insights into class switch recombination. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2**, 147-151.
- Viard, I., Wehrli, P., Bullani, R., Schneider, P., Holler, N., Salomon, D., Hunziker, T., Saurat, J.H., Tschopp, J., French, L.E., 1998. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* **282**, 490-493.
- Wan, Y.Y., Flavell, R.A., 2006. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* **212**, 114-130.
- Wang, D., Wells, S.M., Stall, A.M., Kabat, E.A., 1994. Reaction of germinal centers in the T-cell-independent response to the bacterial polysaccharide alpha(1->6)dextran. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2502-2506.
- Weaver, J.L., Staten, D., Swann, J., Armstrong, G., Bates, M., Hastings, K.L., 2003. Detection of systemic hypersensitivity to drugs using standard guinea pig assays. *Toxicology* **193**, 203-217.
- Wynn, R.L., Meiller, T.F., 1998. CYP enzymes and adverse drug reactions. *Gen Dent* **46**, 436-438.
- Xystrakis, E., Boswell, S.E., Hawrylowicz, C.M., 2006. T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 121-133.
- Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., Rothman, P., Stall, A.M., Pandolfi, P.P., Dalla-Favera, R., 1997. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre

- formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* **16**, 161-170.
- Zanni, M.P., von Greyerz, S., Schnyder, B., Brander, K.A., Frutig, K., Hari, Y., Valitutti, S., Pichler, W.J., 1998. HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *J Clin Invest* **102**, 1591-1598.
- Zhang, X., Izikson, L., Liu, L., Weiner, H.L., 2001. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol* **167**, 4245-4253.
- Zhao, Z., Baldo, B.A., Baumgart, K.W., Mallon, D.F., 2001. Fine structural recognition specificities of IgE antibodies distinguishing amoxicilloyl and amoxicillanyl determinants in allergic subjects. *J Mol Recognit* **14**, 300-307.
- Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., Rudensky, A.Y., 2010. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* **463**, 808-812.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S.L., Jeker, L.T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., Bluestone, J.A., 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* **10**, 1000-1007.
- Zhu, X., Li, J., Liu, F., Uetrecht, J.P., 2011. Involvement of T helper 17 cells in D-penicillamine-induced autoimmune disease in Brown Norway rats. *Toxicol Sci* **120**, 331-338.

謝辞

本学位論文は、大日本住友製薬株式会社 研究本部 前臨床研究所において 2008 年から 2012 年の 5 年間にわたって行われた研究をまとめたもので、本研究の取り組みにおいて、たいへん多くの方々からご指導とご協力を頂いた。ここに記して心から謝意を表する。

本研究に取り組むにあたり、ご指導とご協力頂いた大日本住友製薬株式会社 研究本部 前臨床研究所 安全性第 1 グループ グループマネージャー 宮脇 出氏、同本部 安全性研究所 開発安全性研究部 元研究員 道前 喜子 氏、同本部 前臨床研究所 安全性第 1 グループ 研究員 草柳 亜希子 氏に心から感謝する。

本研究に取り組むにあたり研究環境を整えて下さるとともに、様々な観点からご助言頂いた大日本住友製薬株式会社 研究本部 前臨床研究所 所長 船橋 斉 氏、同本部 安全性研究所 開発安全性研究部 元部長 木村 重紀 博士、同本部 前臨床研究所 安全性第 2 グループ グループマネージャー 山田 徹 博士に心から感謝する。

本学位論文の作成にあたり、暖かいご指導とご教示を賜った京都大学大学院 医学研究科 教授 湊 長博 博士に深甚なる謝意を表するとともに、内容に関してご助言を賜った大阪市立大学大学院 医学研究科 講師 中嶋 康博 博士に謝意を表する。

また、本研究に取り組むにあたり、ご支援、ご協力頂きながら、ここにお名前を記載することができなかった多くの方々に心から感謝する。

最後に、入社後、博士号の取得のために私を長きにわたって鼓舞し、支援し続けてくれた妻に心から感謝するとともに、私を終始暖かく見守り、応援してくれた家族に感謝する。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである.

Akitoshi Tamura, Izuru Miyawaki, Toru Yamada, Juki Kimura, Hitoshi Funabashi

Oral administration of drugs with hypersensitivity potential induces germinal center hyperplasia in secondary lymphoid organ/tissue in Brown Norway rats, and this histological lesion is a promising candidate as a predictive biomarker for drug hypersensitivity occurrence in humans

Toxicology and Applied Pharmacology, 271, 30-40, 2013